

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Física de la Materia Condensada



TESIS DOCTORAL

**Estudio de las propiedades mecánicas de monocapas
de oligonucleótidos y su aplicación a la detección de
microorganismos patógenos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Carmen Martínez Domínguez

Bajo la dirección de las doctoras

Montserrat Calleja Gómez

Priscila Monteiro Kosaka

Madrid (España), 2016

Resumen

En la presente tesis doctoral se ha abordado la caracterización mecánica de monocapas de DNA ancladas a un sensor nanomecánico, la micropalanca, y la optimización de los protocolos de detección de oligonucleótidos sintéticos para tratar de dar respuesta a las cuestiones relacionadas con la estructura y funcionamiento de estas capas y desarrollar una aplicación para detección microbiológica. Para ello se ha estudiado el comportamiento de las monocapas en distintas condiciones utilizando la hidratación y deshidratación como herramienta para generar tensiones entre las moléculas. Los conocimientos obtenidos se han aplicado a la identificación de dos patógenos de elevada relevancia clínica, *Mycobacterium tuberculosis* y *Klebsiella pneumoniae*, y sus resistencias a antibióticos a través de la detección de fragmentos de DNA genómico y plásmidos.

Tabla de contenidos

Motivación	1
Objetivos	5
Capítulo 1. Introducción	
1.1 Biosensores	7
1.2 Sensores nanomecánicos: micropalancas	10
1.3 Funcionalización de la superficie	30
1.4 Estado del arte en el estudio de la hibridación de ácidos nucleicos en palancas	34
Capítulo 2. Materiales y métodos	
2.1 Secuencias de DNA	41
2.2 Reactivos	42
2.3 Soluciones y tampones	44
2.4 Funcionalización de la superficie	44
2.5 Hibridación	49
2.6 Medida de las palancas en modo estático y dinámico	52
2.7 Medida del espesor de las capas de DNA por AFM	56
2.8 Reciclaje de las palancas	57

Capítulo 3. Estudio de la respuesta estática de micropalancas con monocapas de DNA

3.1 Introducción	59
3.2 Estudio de la tensión superficial inducida por la hidratación de SAMs de DNA ancladas a micropalancas	61
3.3 Detección de oligonucleótidos sintéticos	85
3.4 Conclusiones	90

Capítulo 4. Detección de *Mycobacterium tuberculosis* y su resistencia a rifampicina a través de la medida de la tensión superficial

4.1 Introducción	93
4.2 Sondas y técnica de detección	96
4.3 Detección de un amplicón obtenido a partir de la IS6110	98
4.4 Detección de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y su resistencia a rifampicina a partir de muestras de DNA genómico	102
4.5 Conclusiones	108

Capítulo 5. Estudio de la respuesta dinámica de micropalancas con monocapas de DNA

5.1 Introducción	111
5.2 Fuerzas intermoleculares implicadas en una SAM de DNA	112
5.3 Evolución de una SAM de DNA a tiempos de inmovilización crecientes	116
5.4 Caracterización mecánica de las capas de ssDNA	123
5.5 Propiedades mecánicas de las SAMs de DNA en función de su densidad superficial	137

5.6 Conclusiones	141
Capítulo 6. Detección de <i>Klebsiella pneumoniae</i> y su resistencia a carbapenem a través de la medida de la frecuencia de resonancia	
6.1 Introducción	143
6.2 Detección del gen <i>bla_{oxa-48}</i> mediante el análisis de la tensión superficial inducida por la hidratación de las capas de DNA	146
6.3 Propiedades mecánicas de las SAMs de DNA incubadas con el gen <i>bla_{oxa-48}</i>	152
6.4 Detección del gen <i>bla_{oxa-48}</i> mediante el análisis del cambio de frecuencia inducido por la hidratación de las capas de DNA	156
6.5 Conclusiones	161
Conclusiones	163
Apéndice: Calibración del sistema experimental	165
Bibliografía	169
Lista de publicaciones	193

Abreviaturas y símbolos

AFM	Microscopio de fuerzas atómicas
DM	Dinámica molecular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsDNA	Ácido desoxirribonucleico de cadena doble
E	Módulo de Young
E_c	Energía cinética
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas
E_p	Energía potencial
f	Frecuencia de resonancia
gDNA	DNA genómico
HR	Humedad relativa
k	Constante elástica
KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
l_p	Longitud de persistencia
m	Masa
MDR	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> multirresistente
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
ν	Coeficiente de Poisson
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDMS	Polidimetilsiloxano
PLL	Controlador de fase en lazo cerrado
PNA	Ácido peptidonucleico

POC	Sensor de aplicación en el punto de atención al paciente
PSD	Fotodetector sensible a la posición
Q	Factor de calidad
QCM	Microbalanza de cuarzo
ρ	Densidad de masa
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
SAM	Monocapa autoensamblada
SDS	Dodecilsulfato sódico
σ	Tensión superficial
ssDNA	Ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla
t	Espesor
TB	Tuberculosis
TE	Tampón Tris – Ácido etilendiaminotetraacético
UV	Ultravioleta
v	Velocidad
VN	Verdaderos positivos
VP	Verdaderos negativos
XDR	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> extensamente resistente
XPS	Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X
Z	Deflexión
z_{max}	Amplitud máxima de vibración

Motivación

El análisis genético molecular ha supuesto un importante avance para la investigación biomédica, jugando un papel fundamental en el desarrollo de nuevos dispositivos aplicados al diagnóstico de enfermedades, la investigación toxicológica o el descubrimiento de nuevos fármacos.¹⁻³ Concretamente, en el campo de la microbiología clínica se han desarrollado una gran variedad de dispositivos basados en la detección de ácidos nucleicos para el diagnóstico de infecciones, como sensores basados en la amplificación de secuencias por la reacción en cadena de la polimerasa, sensores basados en resonancia de plasmón superficial o sensores electroquímicos.⁴

Sin embargo, el diagnóstico de algunos patógenos sigue representando un reto para estas tecnologías debido, entre otras razones, a la baja concentración de microorganismos en algunos tipos de muestras clínicas,⁵ la baja tasa de crecimiento⁶ o la existencia de resistencias a antibióticos.⁷ Es necesario desarrollar nuevos métodos de diagnóstico que presenten mayor sensibilidad, que permitan reducir al mínimo el tiempo requerido para la obtención de los resultados y que puedan ser ampliamente utilizados en todos los entornos clínicos.

Recientemente, los sensores nanomecánicos basados en la hibridación de ácidos nucleicos en superficie han demostrado un enorme potencial en la detección rápida y ultrasensible de oligonucleótidos,

presentando límites de detección que alcanzan el rango femto – nanomolar.⁸⁻¹¹ Sin embargo, a pesar de su creciente utilización en laboratorios de investigación y de los importantes avances realizados en el campo,¹²⁻¹⁴ la realidad es que estos dispositivos no han logrado un hueco en las prácticas médicas habituales debido a que su reproducibilidad ha sido cuestionada en varias ocasiones.¹² En este sentido, comparten la misma limitación que técnicas más establecidas basadas en el mismo principio de hibridación en superficie, como las micromatrices (*microarrays*) de DNA.^{15,16}

Los dispositivos basados en hibridación de DNA en superficies pueden ser tan fiables como lo es el proceso molecular en el que se fundamentan. Sin embargo, esta hibridación ocurre en un entorno muy diferente del contexto celular en el que tiene lugar de forma natural, y todavía no se entienden totalmente las implicaciones que esto conlleva. La presencia de una superficie y el hecho de que una de las hebras implicadas en el proceso esté anclada a un sustrato cambia drásticamente el progreso del apareamiento.¹⁷⁻¹⁹

Para el establecimiento de estas tecnologías es imprescindible comprender cómo se unen las moléculas de DNA a las superficies, cómo cambian cuando son inmovilizadas, cómo se comportan en condiciones de hacinamiento molecular, cómo puede ser optimizado el evento de reconocimiento molecular y cómo pueden mantenerse estables y viables en condiciones ambientales durante largos períodos de tiempo. La mayor parte de la información disponible acerca de la hibridación de capas de DNA en superficie con resolución molecular procede de trabajos basados en simulaciones teóricas.²⁰⁻²⁴ Por lo que es especialmente necesario llevar a cabo estudios experimentales que nos permitan comprender y

controlar la formación de monocapas receptoras de DNA en superficie, ya que la implementación a gran escala de estos biosensores requiere de interfaces altamente estandarizadas. Sólo de esta forma podremos lograr el desarrollo total del potencial de estos sensores y su aplicación al diagnóstico clínico.

Objetivos

El objetivo principal de esta tesis es el desarrollo de un sensor nanomecánico basado en la hibridación de DNA para la detección de microorganismos patógenos con potencial para ser desarrollado como un sensor de diagnóstico inmediato, utilizado en el punto de atención al paciente. Dado que el cuello de botella para la implementación de estos sensores a gran escala se encuentra en la reproducibilidad mostrada hasta el momento, el desarrollo de este sensor para diagnóstico microbiológico pasa por el estudio exhaustivo de la estructura de las capas de oligonucleótidos anclados al sensor y el proceso de hibridación en superficie.

Se han perseguido los siguientes objetivos específicos:

- Desarrollar un sensor nanomecánico basado en la inmovilización de moléculas de DNA tioladas con respuesta mecánica altamente reproducible y que pueda ser implementable fácilmente en laboratorios por usuarios no expertos. Forma parte de este objetivo la optimización del protocolo de funcionalización con palancas obtenidas de un proveedor comercial, ya metalizadas con la capa de cromo y oro necesarias para la funcionalización basada en moléculas tioladas, así como la reutilización de los sensores utilizados.
- Comprender la respuesta mecánica, tanto estática como dinámica, de las palancas a través del estudio de la estructura y

comportamiento de las capas formadas. El análisis de las propiedades de las capas se realizará mediante el estudio de las interacciones intermoleculares generadas como consecuencia de la hidratación y deshidratación de las mismas.

- Desarrollar un modelo de hibridación del DNA en superficie que permita comprender cómo afecta el anclaje al proceso de reconocimiento molecular y optimizar la detección de secuencias de DNA.

- Desarrollar un biosensor para la detección de microorganismos de relevancia clínica.

En base a estos objetivos, los resultados de esta tesis se explican en cuatro capítulos, que pueden ser agrupados en dos grandes grupos en función del modo de actuación de las palancas empleado para caracterizar las capas de oligonucleótidos y llevar a cabo la detección del DNA: estático (Capítulos 3 y 4) y dinámico (Capítulos 5 y 6). Cada grupo consta de dos capítulos, en el primero se detalla el funcionamiento del sensor y el conocimiento adquirido acerca de la estructura y comportamiento de las capas de DNA, y en el segundo se demuestra la aplicación a la detección de un patógeno y una de sus resistencias a antibióticos.

Capítulo 1

Introducción

1.1 Biosensores

El primer biosensor fue diseñado por Clark y Lyons en 1962, cuando combinaron un sensor electroquímico de oxígeno con la enzima glucosa oxidasa y demostraron la capacidad de determinación cuantitativa de la glucosa en una solución.²⁵ Este y otros estudios posteriores estimularon la integración de elementos de reconocimiento biológico sobre transductores fisicoquímicos, dando lugar a la creación de diferentes biosensores. Desde entonces, los diseños y aplicaciones de estos dispositivos no han dejado de crecer.⁴

Según la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), un biosensor se define como un dispositivo autónomo capaz de proveer información analítica específica, cuantitativa o semi-cuantitativa, utilizando un elemento de reconocimiento biológico que está en contacto directo con un transductor.⁴ Como se deduce de su definición, un biosensor consta de dos elementos básicos. (i) El elemento de reconocimiento biológico consiste en una capa de moléculas biológicas que proporciona los sitios de unión específicos e interacciona con el analito de interés. Entre las interacciones más estudiadas se

encuentran la hibridación de ácidos nucleicos y la interacción antígeno-anticuerpo. Esta capa es la que define la especificidad del sensor. (ii) El segundo elemento es un transductor físico, un dispositivo capaz de detectar la interacción entre el elemento de reconocimiento biológico y las moléculas de la muestra y transformarla en una señal electrónica que es posteriormente procesada.

Los biosensores pueden ser clasificados en función de diferentes criterios. Atendiendo al método de transducción podemos distinguir entre sensores ópticos, eléctricos o mecánicos (Figura 1.1).

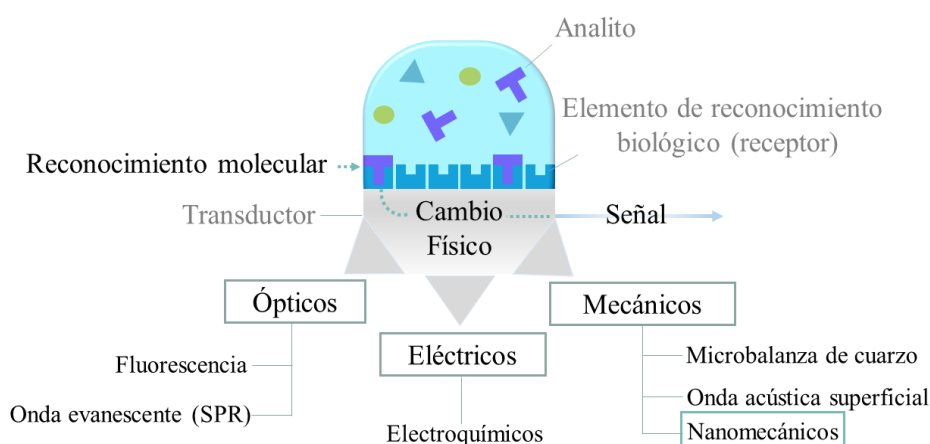


Figura 1.1 | Elementos básicos de un biosensor y clasificación de biosensores atendiendo a la naturaleza de la señal físico-química que se produce e interpreta en el transductor.

Entre los sensores (1) ópticos, una de las técnicas más importantes es la detección basada en la fluorescencia,²⁶ para la cual los analitos o las moléculas de reconocimiento biológico son modificados con una molécula fluorescente. Este tipo de detección es el ejemplo prototípico

de detección con marcaje. El marcaje consiste en una modificación química de alguna de las moléculas que intervienen en el reconocimiento molecular y que actúa como indicadora de la presencia del analito, siendo en este caso el indicador un fluoróforo. Aunque suele mejorar los límites de detección, se trata de un proceso tedioso, costoso, que puede interferir en la función de la molécula marcada y limita el número y tipo de analitos que pueden ser estudiados.²⁷ Una gran parte de los sensores ópticos que funcionan sin marcaje se basa en la medida de la variación del índice de refracción cerca de la superficie del sensor desencadenada por la interacción biológica. De este grupo, el más popular es el basado en la resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés de *Surface Plasmon Resonance*).²⁸

Entre los sensores (2) eléctricos, destacan los dispositivos electroquímicos,²⁹ capaces de detectar moléculas que puedan ser oxidadas o reducidas (por ejemplo, sustratos que interaccionan con enzimas acopladas al electrodo) y cambios en el potencial electroquímico o la resistividad del electrodo. Los avances nanotecnológicos han abierto la puerta al desarrollo de sensores electroquímicos de alta sensibilidad basados en nanotubos y nanohilos semiconductores.³⁰

Por último, entre los biosensores (3) mecánicos, una de las técnicas más establecidas es la microbalanza de cuarzo (QCM, por sus siglas en inglés de *Quartz Crystal Microbalance*).³¹ Este dispositivo se basa en un resonador de cuarzo piezoeléctrico cuya frecuencia de vibración se ve alterada debido a la masa añadida durante la reacción de reconocimiento molecular. Debido a la relación entre deformación y carga eléctrica en un material piezoeléctrico, este cambio se traduce en una medida

eléctrica (voltaje). El mismo principio, pero en sentido inverso rige el funcionamiento de los sensores de onda acústica superficial,³² en los que la aplicación de un campo eléctrico genera la propagación de una onda acústica que se ve alterada tras el reconocimiento molecular. Otro tipo de sensores mecánicos son los sensores nanomecánicos, cuyo funcionamiento está basado en la medida de las deformaciones y movimientos mecánicos del transductor afectados por la unión del analito.³³ Este presenta típicamente forma de trampolín o palanca y, al menos, una de sus dimensiones en el rango nanométrico. El tamaño de estos sensores puede permitir, bajo determinadas condiciones, resoluciones de masa atómicas.³⁴

En la presente tesis doctoral se ha utilizado un transductor nanomecánico para la caracterización de capas de DNA ancladas sobre su superficie y el desarrollo de un biosensor de microorganismos patógenos. Aunque todas las dimensiones de las palancas utilizadas son del orden de micrómetros, pueden ser consideradas sensores nanomecánicos debido a que los desplazamientos y amplitudes de vibración generadas se encuentran en el rango nanométrico y a que se trata de un término ampliamente aceptado en la comunidad científica.³⁵⁻
³⁷ A continuación, se describen con detalle los aspectos relacionados tanto con las micropalancas como con las capas biológicas empleadas.

1.2 Sensores nanomecánicos: micropalancas

El uso de palancas macroscópicas como sensores se remonta a los años 40, cuando fueron propuestas como detectores de hidrógeno,³⁸ pero, salvo muy contadas excepciones, la utilización de transductores basados en estructuras suspendidas resonantes o deformables no se desarrolló plenamente hasta la aparición del microscopio de fuerzas atómicas

(AFM, por sus siglas en inglés de *Atomic Force Microscope*) en 1986.³⁹ El AFM nos permite obtener imágenes de superficies con resolución atómica, medir fuerzas entre moléculas o manipularlas. Generalmente, el elemento sensor del AFM es una palanca de tamaño micrométrico con una punta integrada. En 1994, Thundat *et al.*,⁴⁰ del Oakridge National Laboratory (EEUU), comenzaron a estudiar el potencial de las palancas como sensores físico-químicos y pusieron de manifiesto que tanto la deformación estática como la frecuencia de resonancia de palancas de AFM se veía modificada ante cambios en la temperatura y en la humedad relativa, debidos al efecto bimetalico y a la masa añadida a la superficie de la micropalanca. El descubrimiento de estos efectos, que por una parte generaba derivas indeseadas durante las medidas con el AFM, por otra abría la puerta a multitud de posibilidades en el uso de estas palancas para detección química y biológica. Al mismo tiempo, en Europa, los grupos de Welland y Gerber desarrollaron un sistema de espectroscopía fototérmica utilizando el efecto bimetalico de las palancas metalizadas por una cara.^{41,42} Raiteri y Butt demostraron la medida de la tensión superficial inducida por electroquímica utilizando un AFM.⁴³ Dos años más tarde, Berger *et al.* utilizaron palancas cubiertas de oro para medir *in situ* la tensión superficial inducida por la unión de alcanotioles.⁴⁴ Estas medidas pusieron de manifiesto que la posibilidad de seguir la formación de una monocapa auto-ensamblada en tiempo real.

Actualmente, las palancas presentan una gran versatilidad, pudiendo ser utilizados tanto para la detección directa de un amplio abanico de moléculas,⁴⁵ cambios de temperatura⁴⁶ o fuerzas⁴⁷; como para el estudio de los procesos de reconocimiento molecular que ocurren en su superficie y que dan origen a su comportamiento mecánico.⁴⁸ Desde hace casi dos décadas, estos dispositivos se utilizan como biosensores en los

que el reconocimiento biológico ocurre en la superficie del sensor. Cuando son empleadas de esta forma, la punta es prescindible. Pueden ser fabricadas con diferentes formas, tamaños y materiales. Entre sus ventajas respecto a otras tecnologías³⁵ se encuentran el tiempo de respuesta (menor de milisegundos), límites de detección que alcanzan el rango femto – nanomolar y la posibilidad de ser fabricados en matrices, conteniendo cientos de sistemas nanomecánicos individuales cada una de ellas, lo que permite llevar a cabo una detección múltiple simultánea. También es remarcable que estos sensores no requieren de un marcaje molecular para la detección, pues el reconocimiento molecular en superficie induce un cambio de tensión superficial y un cambio de masa, ambos medibles debido a la muy alta responsividad de estos sensores a las fuerzas y a la masa añadida, lo que permite simplificar la preparación de la muestra y el proceso de detección. En este sentido, cabe destacar que los ensayos más establecidos en investigación biomédica, como los *microarrays* de DNA o el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés de *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), requieren el marcaje de los analitos con moléculas fluorescentes, radioisótopos o enzimas colorimétricas.

El potencial de estos sistemas para la detección de moléculas biológicas no marcadas fue puesto de manifiesto en el año 2000, cuando Fritz *et al.*⁴⁹ demostraron la detección de la hibridación del DNA en tiempo real con micropalanca. Básicamente, las fuerzas generadas por la hibridación de las cadenas complementarias alteran la tensión superficial de la superficie sobre la que se encuentra anclada la capa biológica receptora. Dado que esta capa se encuentra en una sola cara del sensor, la diferencia de tensión superficial entre ambas caras produce una deformación que se puede medir por métodos ópticos o eléctricos.

Midiendo la diferencia de deflexión entre palancas funcionalizadas con secuencias de cadena sencilla de DNA complementarias y no complementarias cuando eran expuestas a la hebra problema, pudieron incluso demostrar la capacidad de la técnica de detectar mutaciones de una sola base. Progresivamente, se han ido mejorando los procesos de fabricación de palancas, los protocolos de funcionalización con sondas de DNA y el montaje de los sistemas experimentales, con el objetivo de conseguir mayor sensibilidad y ahondar en la comprensión de los mecanismos moleculares de la tensión superficial generada por la hibridación.^{8-10,50} También se han desarrollado aplicaciones en los campos de la proteómica, la glicómica y la microbiología; así como para la detección de gases y drogas.²⁷

1.2.1 Modos de operación

Una palanca es un resonador, es decir, vibra de forma natural a determinadas frecuencias, llamadas frecuencias de resonancia, con mayor amplitud que a otras. A cada frecuencia de resonancia la palanca vibra con un perfil de amplitud determinado, llamado modo de vibración. Además, la palanca puede estar sometida a procesos que inducen su deformación estática. Esencialmente la deformación estática se diferencia de la deformación debida a la vibración (dinámica) en la escala de tiempo en la que se producen. Para hacernos una idea: el primer modo de vibración de las palancas utilizadas en esta tesis se encuentra en torno a 5 kHz, lo que implica que las deformaciones dinámicas se producen en el rango de los 10^{-4} s, mientras que las deformaciones estáticas se producen en el rango de los segundos.

Como veremos más adelante, el comportamiento de la palanca se aproxima por el modelo del oscilador armónico, que supone una simplificación al asumir que la palanca se comporta como un muelle con una masa en uno de los dos extremos, estando fijo el otro.

En función de la deformación que se mide, se diferencian dos modos de operación de las palancas: (i) el modo estático, cuando la magnitud medida es la deformación o deflexión estática, y (ii) el modo dinámico, cuando la magnitud medida es la frecuencia de resonancia de la palanca. La deflexión estática es sensible a los cambios en la energía libre de la superficie, debidos a la adsorción molecular y a efectos térmicos, eléctricos o magnéticos. La frecuencia de resonancia es sensible a cambios en la masa y rigidez de la palanca. Por tanto, ambos pueden proporcionar información acerca del analito a detectar, como su concentración, propiedades y/o implicación en el proceso biológico analizado.^{8,51}

1.2.1.1 Modo estático

También denominado modo DC o de tensión superficial. La tensión superficial fue definida por J.W. Gibbs como la cantidad de trabajo reversible por unidad de superficie necesaria para estirar elásticamente una superficie pre existente.⁵² Cuando las moléculas analito interaccionan con la capa bio-receptora situada sobre la superficie de la palanca, las fuerzas generadas como consecuencia de las interacciones producidas entre los analitos y la capa receptora y entre analito-analito generan una variación de energía superficial que se minimiza por la expansión o contracción elástica de dicha superficie. Si esta tensión se

produce únicamente sobre una cara de la superficie, ésta es asimétricamente tensionada y se deforma.

La fuerza necesaria para producir la deflexión de una palanca puede aproximarse por la ley de Hooke, que establece que la fuerza requerida para comprimir o extender un muelle una distancia z , es proporcional a esa distancia: $F = -k\Delta z$. Al factor de proporcionalidad, k , se le llama constante elástica. La constante elástica determina la flexibilidad y sensibilidad de la palanca y está definida por las dimensiones de la misma y las propiedades del material. Para una palanca rectangular:

$$k = \frac{Ewt^3}{4L^3} \quad (1.1)$$

donde E es el módulo de Young o módulo de elasticidad, L es la longitud, w la anchura y t el espesor. La geometría más utilizada para la fabricación de estos biosensores es la palanca debido a su baja k .

La variación de tensión superficial se relaciona con la curvatura de la superficie a través de la ecuación de Stoney (1.2), que predice una relación lineal entre el cambio de tensión superficial ($\Delta\sigma$) y el cambio de curvatura ($\Delta\kappa$),

$$\Delta\kappa = 6 \frac{1 - \nu}{Et^2} \Delta\sigma \quad (1.2)$$

donde ν es el coeficiente de Poisson del material que se deforma. La ecuación (1.2) asume que la palanca es isotrópica y homogénea, que el espesor de la misma es pequeño comparado con las dimensiones laterales y que las deformaciones y rotaciones son despreciables. Esto se cumple para (i) las micropalancas más comúnmente utilizadas, con dimensiones en el rango de 100 – 500 μm de longitud, 10 – 100 μm de anchura y 0.1

– 1 μm de espesor; (ii) tensiones generadas por películas finas comparadas con el espesor de la palanca y (iii) deflexiones pequeñas, de tal modo que podemos asumir que la curvatura de la palanca es circular.³⁶

La ecuación más utilizada para relacionar la tensión superficial con la deflexión de la palanca se deriva de la ecuación de Stoney (1.2):

$$\Delta\sigma = \frac{Et^2}{3(1-\nu)L^2} \Delta z \quad (1.3)$$

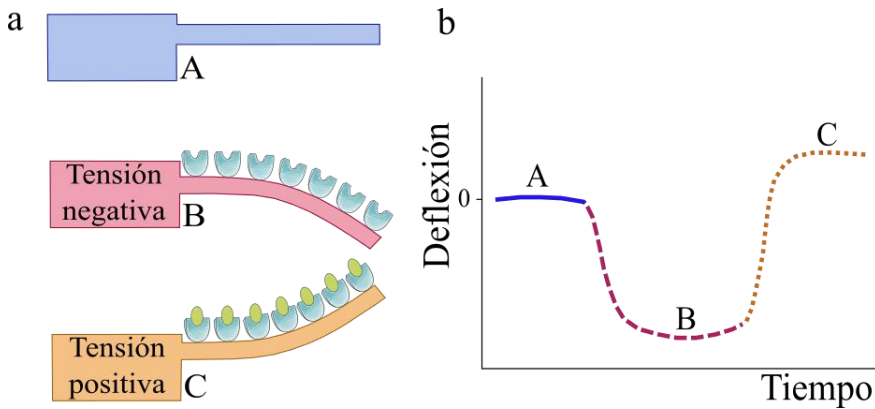


Figura 1.2 | Modo estático. a) Representación esquemática del efecto en la deflexión de tensión superficial compresiva, debida a fuerzas repulsivas (B) o de tensión debida a fuerzas atractivas entre las moléculas ancladas a la superficie (C). **b)** Deflexión medida para cada situación representada en a).

La deflexión de la palanca puede ser hacia o en contra de la superficie pasiva, es decir, la que no ha sufrido el reconocimiento molecular. En el primer caso la tensión es negativa, pudiéndose denominar compresiva (la superficie activa se expande). En el segundo la tensión es positiva (la superficie activa se contrae). En la Figura 1.2 se

muestra una representación de los tipos de tensión superficial que puede sufrir la palanca (Figura 1.2 a)) y una gráfica de la deflexión que mediríamos en cada caso (Figura 1.2 b)). Hay que destacar que cuando hablamos de detección de tensión superficial siempre nos referimos a cambios relativos de la tensión superficial, no a valores de tensión absolutos.

Existen diferentes mecanismos responsables de la generación de tensión superficial. (i) En el primero, la tensión superficial se origina como consecuencia de la redistribución de la nube electrónica que rodea a los átomos superficiales, lo cual modifica las interacciones interatómicas. Este mecanismo es el que domina en los procesos de quimisorción, en los que se puede dar transferencia de electrones entre el adsorbato y los átomos superficiales. La tensión superficial inducida por este mecanismo es linealmente proporcional a la cobertura superficial. Este mecanismo es el responsable de la tensión superficial sufrida por micropalancas cubiertas de oro durante el autoensamblaje de alcanotioles o moléculas biológicas modificadas con un grupo tiol (DNA, proteínas).⁵³ Sin embargo, esta contribución es, generalmente, despreciable durante los procesos de reconocimiento molecular, ya que el ligando se encuentra separado de la superficie varios nanómetros (la altura del receptor). (ii) En el segundo, la tensión superficial surge de las interacciones en el plano que emergen entre los complejos moleculares situados en la superficie, como las fuerzas electrostáticas, puentes de hidrógeno, la fuerza inducida por el coste entrópico de restringir los movimientos moleculares y las interacciones de desolvatación, debidas al enterramiento de los residuos hidrofóbicos para minimizar el contacto con el solvente acuoso y que generan la liberación de las capas de solvatación al mismo durante el reconocimiento molecular.⁵³⁻⁵⁵ (iii) Un

tercer mecanismo es el bien conocido efecto bimetalico, que ocurre en sistemas formados por capas de diversos materiales y es debido a una diferencia en sus coeficientes de expansión térmica. La mayor expansión de alguno de los materiales en la multicapa como consecuencia de una variación de temperatura origina una diferencia de tensión y, por tanto, una deformación.⁵³

Por lo general, los biosensores nanomecánicos basados en tensión superficial requieren elevadas densidades de empaquetamiento de los receptores moleculares para maximizar la respuesta generada por la unión del ligando. En otras palabras, para la generación de cantidades significativas de tensión superficial es necesario tener una superficie con una alta concentración de receptores para maximizar las interacciones estéricas repulsivas, la presión osmótica de los iones y las fuerzas de hidratación.³⁶ Se ha demostrado que el reconocimiento molecular sobre la superficie de la palanca no es capaz de generar una señal de tensión superficial detectable por debajo de una densidad superficial de receptores crítica. Esto significa que la generación de tensión superficial es un fenómeno colectivo que requiere una cobertura mínima de la superficie para conseguir la conexión entre todas las regiones funcionalizadas de la superficie.⁵⁴

Los ensayos más importantes y con menores límites de detección logrados con sistemas nanomecánicos están basados en la medida de la tensión superficial.^{8,9,11,35,50,56,57} En la mayor parte de ellos las matrices con las micropalancas se colocan en una celda de fluidos con canales de entrada y salida para circular las soluciones tampón y los analitos, y el desplazamiento de las palancas es monitorizado en tiempo real mientras las soluciones fluyen por las palancas. Las micropalancas como sensores

de tensión superficial han sido aplicadas a la detección de DNA,⁴⁹ RNA mensajero en muestras de RNA total celular,¹⁰ marcadores proteicos de cáncer como el antígeno específico prostático (PSA) en muestras con albúmina sérica y plasminógeno humanos,⁵⁸ la hormona del crecimiento humano,⁵⁹ marcadores de infarto agudo de miocardio como la creatín kinasa y la mioglobulina⁶⁰ y antibióticos, como la kanamicina.⁶¹

1.2.1.2 Modo dinámico

También denominado modo AC o de resonancia. En este caso las palancas son excitadas a su frecuencia de resonancia, que se encuentra en el rango de los kHz para las palancas utilizadas en esta tesis, mediante materiales piezoeléctricos⁶² o por excitación fototérmica.⁶³ Las micropalancas se comportan como osciladores armónicos, cuya frecuencia de resonancia (f) se define de forma aproximada por la ecuación (1.4):

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}} \quad (1.4)$$

siendo k la constante elástica y m la masa efectiva de la palanca. En este caso la constante elástica (ecuación 1.5), k , depende del módulo de Young, E ; de la geometría del resonador, donde L es la longitud, w la anchura y t el espesor; y del modo de vibración, , cuya constante β_n para el primer modo de vibración, también llamado modo fundamental, vale $\beta_1 = 1.8751$.

$$k = \frac{Ewt^3}{12L^3} \beta_n^4 \quad (1.5)$$

La frecuencia de resonancia puede ser considerada como el resultado del balance energético entre la energía cinética y la potencial. Mientras que la energía cinética depende de la masa del resonador, la energía potencial se ve afectada por su elasticidad y, por tanto, por los diferentes procesos que influyen en este parámetro.⁶⁴

Uno de estos procesos que afectan a la frecuencia a través de cambios en la rigidez de la palanca es la tensión superficial. Los responsables de este efecto son el anclaje de las palancas y el cambio elástico de sus dimensiones generado por la tensión superficial. Excepto este último efecto, que sigue generando controversia, todos los demás procesos que afectan a la rigidez están bien caracterizados.³⁶ Por lo tanto, un sistema nanomecánico oscilando a su frecuencia natural de resonancia funciona como un sensor de masa y rigidez de gran precisión (ver Figura 1.3).

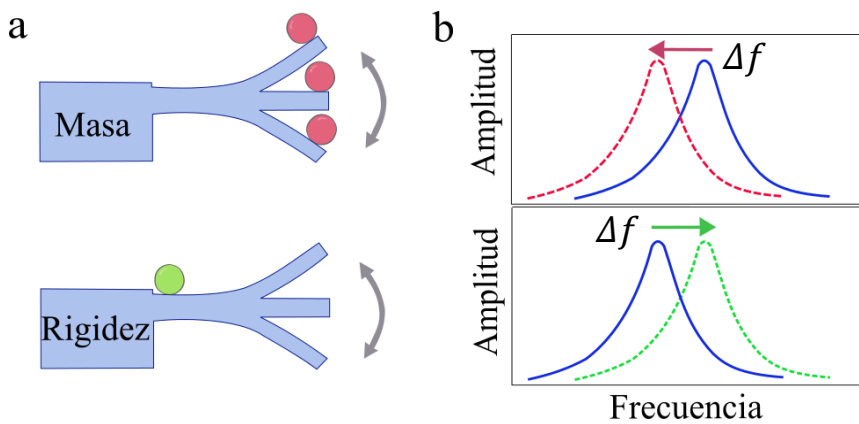


Figura 1.3 | Modo dinámico. Representación de un resonador actuando como sensor de masa y de rigidez. Cuando una masa se adsorbe sobre el extremo libre (a) arriba), la frecuencia disminuye debido al aumento de masa efectiva (b) arriba). Cuando se adsorbe sobre la zona de anclaje (a) abajo), la frecuencia aumenta debido al aumento de rigidez (b) abajo).

El efecto de la masa es mayor cuando la adsorción tiene lugar en las regiones con mayor amplitud de vibración a lo largo de la palanca (extremo libre de la palanca en el primer modo de vibración, mayor energía cinética), mientras que el efecto de rigidez aumenta en las regiones en las que la palanca sufre mayores cambios de curvatura durante la vibración (zona de anclaje, mayor energía potencial).⁶⁴ La sensibilidad o responsividad en masa es inversamente proporcional a la masa inercial del resonador, aumentando a medida que esta disminuye.

En modo dinámico se han demostrado límites de detección en vacío en el rango de la masa de átomos y moléculas, llegando recientemente hasta el rango de los yoctogramos (10^{-24} g).^{65,66} Con estos límites de detección se podría medir la masa de un solo protón. Pero cuando queremos detectar moléculas biológicas en un entorno fisiológico, el amortiguamiento viscoso del medio supone una limitación importante para estas medidas. En estos casos, las respuestas mecánicas de los sensores presentan factores de calidad muy bajos (ver 1.2.1.2.1 para definición de *factor de calidad*). La detección *ex situ* de las moléculas problema en modo dinámico es una alternativa a las medidas en tiempo real que ha permitido alcanzar límites de detección en el rango de femtogramos por mL (fg/mL) del antígeno prostático específico (PSA) utilizando nanopartículas como marcaje secundario.^{67,68} Este tipo de marcaje ha sido empleado también para la detección ultrasensible de DNA.⁶⁹

1.2.1.2.1 Ruido termomecánico y factor de calidad

El funcionamiento de los sensores nanomecánicos puede verse limitado por diversas fuentes de ruido. Aunque existen diferentes tipos de ruido que afectan a las palancas, el ruido termomecánico, causado por los mecanismos de disipación energética en el interior de la palanca, es el último determinante de los límites de detección de los sensores nanomecánicos.⁷⁰ Cuando una palanca se encuentra en equilibrio térmico con el medio que la rodea, conocido comúnmente como “baño térmico”, hay un intercambio continuo entre la energía mecánica almacenada en el dispositivo y la energía térmica del medio. Este intercambio da como resultado la vibración espontánea de la palanca. La palanca fluctúa debido a los impactos aleatorios de las moléculas circundantes y, a su vez, disipa la energía mecánica almacenada a través de su interacción con las moléculas circundantes.

La disipación de energía implica que estos resonadores tienen un factor de calidad (Q) finito. El factor de calidad se define como $Q = \frac{2\pi W_s}{W_d}$, donde W_s es la energía vibracional almacenada, que es igual al valor máximo de la energía cinética, y W_d es la energía disipada por cada ciclo de vibración. El factor de calidad Q determina la precisión de la medida de la frecuencia de resonancia, ya que viene dado por la pendiente de la curva de amplitud cerca de la resonancia. Cuanto mayor sea el factor de calidad, más estrecho es el pico de resonancia. También se puede definir como $Q = \sqrt{3} \frac{f_0}{\Delta f}$, donde Δf es la anchura del pico de resonancia a la mitad del máximo de amplitud (ver Figura 1.4).

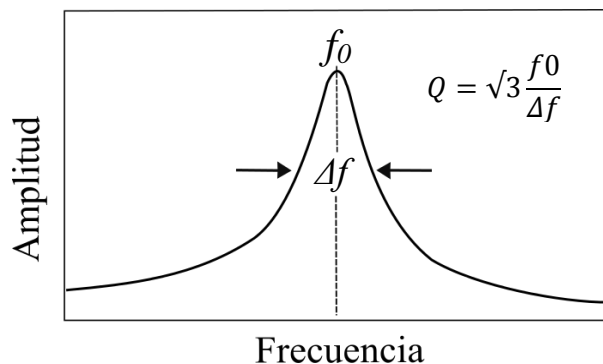


Figura 1.4 | Cálculo del factor de calidad, Q , de un espectro termomecánico.

1.2.1.2.2 Excitación

El movimiento de una palanca en un fluido se ve afectado por dos mecanismos diferentes: por un lado, la masa añadida que supone la columna de fluido desplazada por la palanca en su vibración; por otro, el rozamiento viscoso. Como consecuencia de estos dos factores se reduce la frecuencia de resonancia, el factor de calidad y la amplitud de vibración, además de la relación señal-ruido. Para aumentar la amplitud de vibración de la palanca y mejorar la relación señal-ruido se utilizan diferentes métodos de excitación.⁷¹⁻⁷⁴

La excitación mecano-acústica o piezoeléctrica es el método de excitación más extendido y el que se ha utilizado en esta tesis. En este método se utiliza una pequeña lámina de material piezoeléctrico adosada al resonador o a la celda de medida. En nuestro caso la cerámica piezoeléctrica se encuentra en contacto directo con la matriz de palancas. La piezoelectricidad (del griego *piezein*, “estrujar o apretar”) es una propiedad que presentan determinados cristales, que al ser sometidos a

tensiones mecánicas adquieren una polarización eléctrica, apareciendo una diferencia de potencial y cargas eléctricas en su superficie. Este fenómeno también se presenta a la inversa, es decir, se deforman bajo la acción de fuerzas electrostáticas internas al ser sometidos a un campo eléctrico externo. Por lo tanto, es posible excitar la palanca generando una señal con un generador de funciones que barra en frecuencia la zona del espectro de interés e inyectándola en la cerámica piezoeléctrica a través de contactos eléctricos.

1.2.2 Sistemas de lectura

Los sistemas de lectura deben ser capaces de monitorizar el movimiento de la palanca en tiempo real y con resolución sub-nanométrica. Todos los sistemas se pueden clasificar en dos grandes grupos: ópticos y eléctricos. Ambos pueden presentar la resolución deseada y, además, ser implementados en sistemas de matrices con el objetivo de medir simultáneamente varios dispositivos.^{60,75,76}

Los métodos eléctricos más extendidos son los métodos i) piezorresistivos,^{77,78} basados en el cambio de resistividad de un material debido a la deformación sufrida; los ii) capacitivos,⁷⁹ basados en la medida de la capacitancia entre el sensor y un electrodo paralelo; y los iii) piezoeléctricos,^{80,81} que presentan una capa de material piezoeléctrico. Debido al efecto piezoeléctrico, cuando se deforma la palanca se inducen cargas transitorias que son medidas. Los métodos ópticos se explican con mayor detalle a continuación.

1.2.2.1 Sistemas de lectura ópticos

En el campo de los sensores nanomecánicos, los métodos de lectura ópticos⁸² son los más utilizados, ya que pueden ser fácilmente implementados en vacío, aire y líquidos. Estas técnicas se han ido desarrollado de tal forma que es posible tener una medida de los desplazamientos y las vibraciones del sistema nanomecánico completo, y no sólo de un único punto.³⁶ La detección óptica implica un equipo voluminoso, por lo que es más adecuada como sistema de sobremesa, pero ofrece una enorme flexibilidad en cuanto a la fabricación de los sistemas, lo que favorece el desarrollo de conceptos novedosos, y permite obtener resoluciones de medida excelentes.

Las técnicas ópticas se clasifican en i) interferométricas^{83,84} y ii) deflexión de haz.^{40,82} Las técnicas interferométricas se basan en la interferencia constructiva y destructiva que se produce cuando un haz de luz colimado se refleja entre dos superficies paralelas que se desplazan entre sí. Se emplean cuando se requiere una gran relación señal-ruido. El método basado en la deflexión de haz se explica a continuación, ya que es el que se ha utilizado en la presente tesis.

1.2.2.1.1 Deflexión de haz

Esta técnica es una de las más sensibles, económicas y extendidas para cuantificar las deflexiones de la palanca, tanto estáticas como dinámicas. La técnica se basa en la reflexión de un haz de luz sobre el extremo libre de la palanca que es recogido por un detector sensible a la posición (PSD, por sus siglas en inglés de *Position Sensitive Detector*). La fuente de luz más común es el láser de diodo. El fotodetector se

encarga de la conversión de la energía luminosa que recibe en una señal eléctrica que puede ser amplificada, comparada con otras y monitorizada. La deflexión de la palanca cambia la posición del haz de luz reflejado sobre el PSD debido al cambio del ángulo de reflexión.

En un experimento típico el haz de luz reflejado sobre la superficie de la palanca se hace incidir en el centro del PSD. Cuando la palanca se dobla, el haz láser reflejado se desplaza sobre la superficie del PSD, lo que provoca un cambio en la señal eléctrica generada por el PSD que nos permitirá calcular la deflexión de la palanca. La relación exacta entre la deflexión de la palanca y el voltaje medido por el PSD se obtiene por óptica geométrica elemental y análisis vectorial^{53,85} o calibrando el equipo a partir de la medida de la amplitud de vibración de una micropalanca de dimensiones conocidas que vibra debido al ruido termomecánico y sin excitación externa.^{86,87} La calibración realizada en la presente tesis doctoral está descrita en detalle en el Apéndice: Calibración del sistema experimental utilizando el ruido termomecánico de la palanca.

Esta técnica permite la medida de matrices de palancas. Se puede implementar de dos formas distintas. Una de ellas consiste en colocar diferentes fuentes de luz y detectores, tantos como palancas tenga la matriz que queremos medir.⁸ Esta aproximación permite una medida simultánea de todas las palancas, pero requiere la integración de una gran cantidad de fuentes de luz independientes, además de todos los detectores, lo que hace que el procesado de la señal sea complejo. La otra aproximación consiste en montar el haz laser sobre motores que se desplazan en las direcciones perpendicular y paralela al eje largo de la palanca. Los haces se recogen todos en el mismo PSD.^{85,88} Esta última

aproximación es la que se ha empleado para la medida de las palancas en matrices en esta tesis. La Figura 1.5 muestra un esquema de la técnica de medida por deflexión de haz acoplada a motores microposicionadores en X e Y.

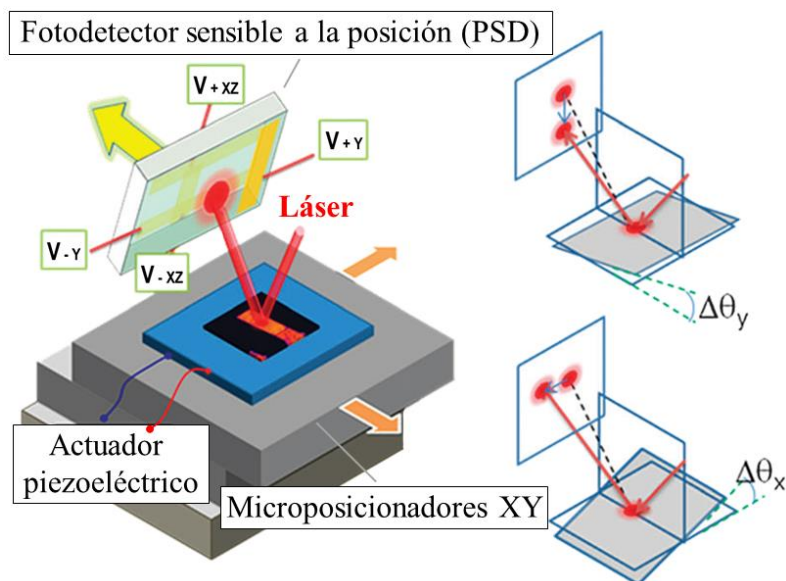


Figura 1.5 | Esquema de la técnica de medida por deflexión de haz acoplada a un sistema de microposicionamiento para la medida de matrices

1.2.2.1.2 Sistema de posicionamiento del haz láser mediante espejos retroalimentados

La versatilidad de los sensores nanomecánicos para medir interacciones moleculares complejas se basa en sus dos posibles modos operacionales, estático y dinámico. Sin embargo, la respuesta de un PSD no es uniforme a lo largo de toda su superficie. Por ello, cuando se mide la frecuencia de resonancia de una palanca que está sometida a procesos que inducen su deformación estática, el cambio de posición del haz láser sobre el PSD debido a esta deflexión genera un cambio de frecuencia

artefactual. En la Figura 1.6 se muestran los cambios de frecuencia artefactuales (línea roja) medidos debidos a cambios de posición del haz láser (línea azul) sobre el PSD. Se ha movido el PSD en el eje vertical de forma secuencial, de tal forma que se midiera un cambio de posición del haz láser equivalente a una deflexión de la palanca de 200 nm aproximadamente con cada movimiento. Como podemos ver se da un cambio de 0.5 Hz aproximadamente por el equivalente a 100 nm de desplazamiento.

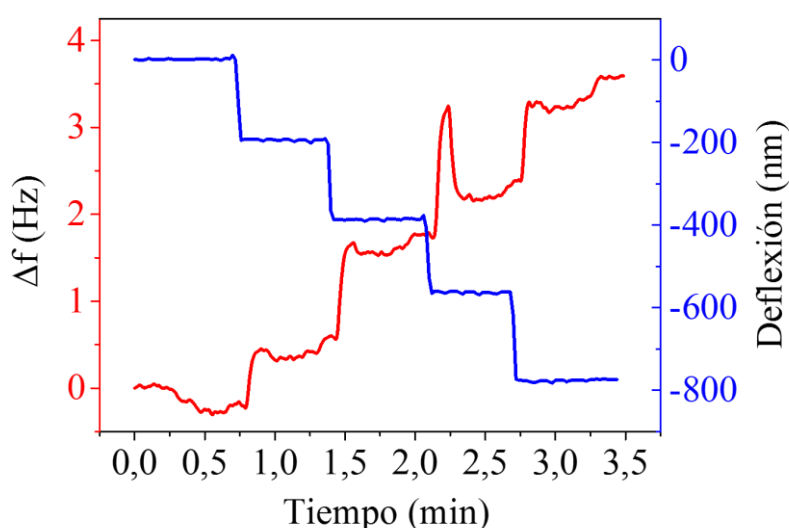


Figura 1.6 | Cambios de frecuencia artefactuales debidos a cambios de posición del haz láser sobre el PSD. El PSD se movió en la vertical cuatro veces consecutivas de tal forma que el haz láser se desplazase el equivalente a una deflexión de la palanca de 200 nm en cada movimiento (línea azul). La línea roja representa la frecuencia de resonancia medida de forma simultánea al movimiento del PSD.

Para prevenir este artefacto y poder recoger información tanto de la deflexión estática como de la vibración del sensor simultáneamente, se

ha utilizado un sistema de posicionamiento mediante espejos retroalimentados (Thorlabs GmbH, Alemania). Los espejos, introducidos en el camino óptico del láser (Figura 1.7), son accionados por un motor automatizado por un circuito de retroalimentación cerrado. La salida del PSD se transforma en una señal de entrada a los motores, que controlan los ángulos de giro de los espejos de tal forma que el haz láser incida siempre en el centro del PSD. La señal de salida del PSD se divide en dos señales: una retroalimenta los motores que mueven los espejos y la otra se analiza para obtener la frecuencia. Así, el ángulo de giro de los espejos se utiliza para calcular la deflexión estática de la palanca, mientras que la frecuencia de resonancia queda libre de artefactos.

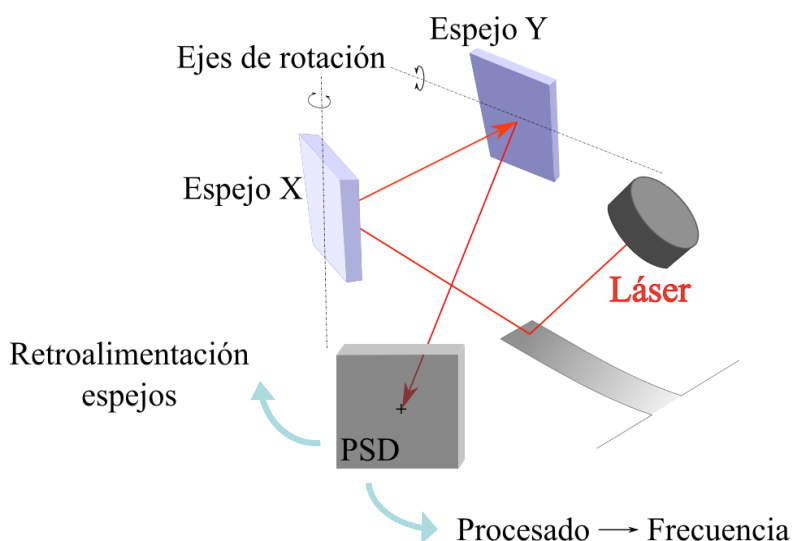


Figura 1.7 | Representación esquemática del sistema de posicionamiento mediante espejos retroalimentados.

1.3 Funcionalización de la superficie

Para convertir un sistema nanomecánico en un biosensor, este debe ser cubierto por un elemento de reconocimiento biológico, que suele ser una capa de ácidos nucleicos, proteínas o carbohidratos. A este proceso se le denomina funcionalización, y abarca (i) la modificación química de la superficie con el objetivo de generar grupos reactivos que unan firmemente el elemento de reconocimiento, (ii) la inmovilización de dicho elemento y (iii) el bloqueo de las zonas que hayan quedado descubiertas tras el paso (ii) para minimizar la adsorción inespecífica. Tras la inmovilización de los receptores biológicos, se debe mantener su actividad natural, así como su biodisponibilidad para el reconocimiento y la estructura de una capa robusta, homogénea y reproducible.¹²

1.3.1 Monocapas autoensambladas (SAMs) de DNA sobre oro

Se considera que se ha formado una monocapa autoensamblada (SAM, por sus siglas en inglés de *Self-Assembled Monolayer*) cuando las moléculas que cubren la superficie del sensor se adsorben espontáneamente y se combinan de tal manera que forman una estructura secundaria más compleja en la que presentan menos grados de libertad y en la que las fuerzas intermoleculares generadas entre ellas juegan un papel principal.⁸⁹ El procedimiento más común para generar monocapas autoensambladas sobre superficies consiste en inmovilizar moléculas tioladas sobre oro.

Las superficies de oro son ampliamente utilizadas para la formación de SAMs porque son fáciles de preparar y limpiar, debido a su inercia

química a temperatura ambiente, y porque forman un enlace de carácter covalente con los grupos tiol ($-SH$) formando enlaces tiolato – oro ($RS-Au$).⁹⁰ En el caso concreto de los sensores nanomecánicos basados en palancas, que se suelen fabricar de silicio o nitruro de silicio, la deposición de una superficie de oro sobre una cara de la palanca provee la asimetría requerida para la generación de una tensión diferencial o asimétrica entre una y otra cara, y por tanto una deformación. La capa de oro suele tener unos 20 – 30 nm de espesor y se deposita tras una capa intermedia de adhesión de cromo, titanio o níquel de unos 2 – 5 nm de espesor. Esta capa mejora la adhesión de los metales inertes, como el oro, a la superficie de óxido de silicio nativo de la palanca.⁹¹

Las moléculas utilizadas para formar las SAMs están constituidas por tres partes: (i) el grupo funcional de unión a la superficie, (ii) una cadena hidrocarbonada de longitud variable y (iii) el grupo terminal que determina la especificidad del sensor frente al analito a detectar y las propiedades de la superficie funcionalizada. Las cadenas hidrocarbonadas facilitan un empaquetamiento más eficiente gracias a las interacciones hidrofóbicas que establecen entre sí.⁸⁹ En la Figura 1.8 se muestra una SAM prototípica de alcanotioles⁹¹ (izq.) y la SAM que se ha estudiado y utilizado en los biosensores de esta tesis (dcha.). Estas últimas son SAMs de DNA modificadas con (i) un grupo tiol, (ii) una cadena hidrocarbonada de tres carbonos y (iii) una cadena de DNA de longitudes comprendidas entre 20 y 30 bases.

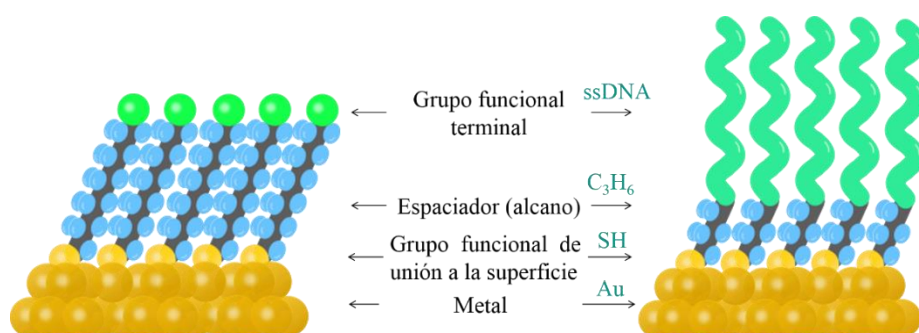


Figura 1.8 | Esquema de una SAM típica (izq.) y de la SAM de DNA empleada en esta tesis (dcha.).

En la literatura está ampliamente extendida la idea de que las SAMs presentan, generalmente, un alto nivel de orden estructural. Sin embargo, estudios recientes han demostrado la dificultad de obtener capas bioreceptoras ideales, incluso en el caso de las capas autoensambladas.⁹² Los defectos de las SAMs pueden ser debidos a causas extrínsecas, como la limpieza de las superficies, las propias características (topografía, rugosidad, etc.) de los mismos o la pureza de las soluciones de adsorbato; pero muchos de ellos se deben simplemente a que las SAMs son sistemas dinámicos que presentan comportamientos complejos.⁹¹ Por tanto, cabe esperar que las respuestas de los sensores basados en estas capas se vean afectadas por esta complejidad estructural.

1.3.2 Sistemas de funcionalización

Existen varios métodos para funcionalizar las palancas de una matriz. El más sencillo consiste en incubar la matriz directamente en una solución que contenga las moléculas que van a formar las SAMs, lo que conlleva funcionalizar con la misma molécula todas las palancas. Si lo

que se persigue es funcionalizar con diferentes moléculas diferentes palancas dentro de una misma matriz, se puede llevar a cabo de las siguientes maneras: (i) mediante su incubación en microcapilares de vidrio manejados por microposicionadores;⁸⁸ (ii) mediante impresión por inyección;⁹³ (iii) o integrando los sensores en sistemas de microfluídica.^{94,95} En esta tesis se han empleado la incubación directa en la solución y la impresión por inyección mediante un equipo piezo-dispensador.

1.3.2.1 Generación de SAMs de DNA mediante impresión por inyección

Estas “impresoras” son dispositivos comerciales que permiten depositar volúmenes de cientos de picolitros sobre posiciones deseadas con una precisión de decenas de micrómetros. En la Figura 1.9 se muestra (a) el equipo utilizado en esta tesis, (b) un detalle del capilar piezo-dispensador preparado para depositar la muestra sobre una palanca y (c) la eyección de una gota. Constituyen una técnica madura en la fabricación de *microarrays* de ácidos nucleicos y proteínas y se han comenzado a utilizar recientemente para la funcionalización de sensores nanomecánicos. Esta técnica presenta las ventajas de ser rápida, versátil, adecuada para la implementación a gran escala y no dañina con las palancas, ya que los capilares no contactan directamente con su superficie. Sin embargo, las capas han de formarse en tiempos extremadamente cortos, debido a la rápida evaporación de las gotas, lo que supone un mayor desorden y menos empaquetamiento de las mismas.^{27,91} En esta tesis se demuestra que esta desventaja no impide su correcta utilización para discriminar y detectar secuencias de DNA diana.

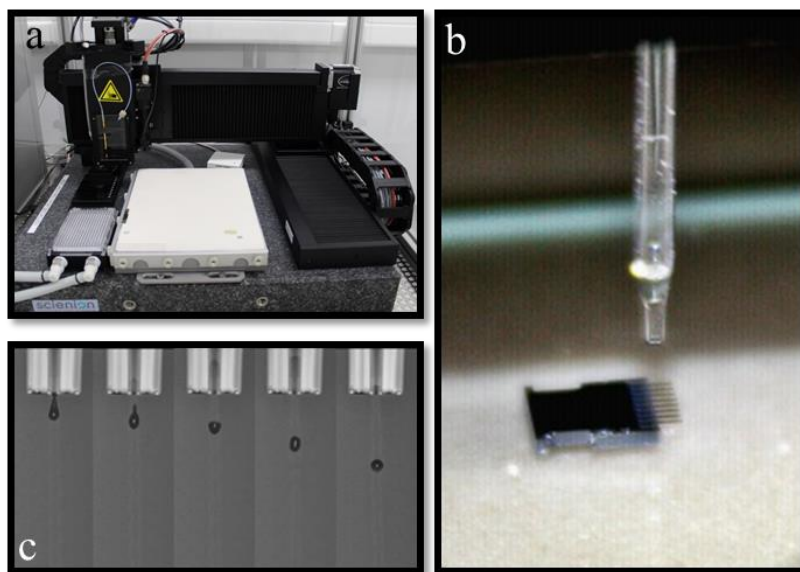


Figura 1.9 | Piezo-dispensador de gotas sin contacto. a) Impresora de matrices utilizada para funcionalizar las palancas con diferentes moléculas. b) Detalle del capilar dispensador sobre una matriz de palancas. c) Formación de una gota.

1.4 Estado del arte en el estudio de la hibridación de ácidos nucleicos en palancas

Como se ha mencionado anteriormente, la primera prueba de concepto que demostró la capacidad de las palancas para detectar una molécula biológica fue realizada en el año 2000 por Fritz *et al.*⁴⁹ El ensayo consistía en la inmovilización de oligonucleótidos de 12 a 16 bases de longitud sobre palancas de silicio recubiertas con oro por deposición por haz de electrones térmica y la medida de las deflexiones estáticas en tiempo real en una pequeña celda de líquidos. Con una relación señal-ruido de ~ 5 , detectaron una hebra complementaria a una concentración de 80 nM. La magnitud de las señales de deflexión

obtenidas se encuentra dentro del error dado por otros procesos que ocurren cuando se sigue la hibridación *in situ* sobre las palancas en un medio líquido, como derivas térmicas, variaciones locales del pH, el flujo del líquido o la adsorción inespecífica de moléculas sobre la monocapa de DNA. Por tanto, se hacía necesaria una referencia para filtrar todas estas señales. Algunas palancas se funcionalizaron con una secuencia no relacionada que actuaba como referencia interna. A cada señal generada por una palanca al hibridar se le restó la señal de una palanca de referencia (no hibridada) para eliminar señales espurias producidas por los motivos mencionados. De esta forma fueron capaces de detectar una única mutación en el oligonucleótido diana. Con la misma metodología Hansen *et al.*⁴⁸ estudiaron, además, el efecto de la posición de las mutaciones en los oligonucleótidos al hibridar. En este trabajo fueron capaces de detectar la hibridación debida a 4 bases, difiriendo 1 nm la deflexión entre una palanca con hibridación perfecta y una con una mutación. Poco más tarde, sin llegar a mejorar el límite de detección alcanzado por el primer trabajo,⁴⁹ McKendry *et al.*⁸ demostraron la posibilidad de utilizar las palancas para calcular parámetros termodinámicos, como la constante de disociación, K_d , o la variación de energía libre, ΔG° , de la reacción de hibridación de las secuencias estudiadas. En trabajos posteriores, se mejoraron los límites de detección, alcanzando el rango pM tanto para DNA como para RNA, y se empezaron a detectar ambas moléculas en muestras con DNA genómico.^{9,10} También se demostró que las palancas podían ser utilizadas para estudiar cambios conformacionales de moléculas biológicas. Sirva como ejemplo el trabajo de Biswal *et al.*⁹⁶ en el que el estudio de la tensión generada sobre palancas con DNA de doble cadena

en función de la temperatura permitió la determinación de las temperaturas de fusión de las secuencias en diferentes condiciones.

Mención especial merece el trabajo de Mertens *et al.*¹¹ por ser el germen de esta tesis. Este es el primer trabajo en la categoría de detección de DNA en palancas en el que las medidas no se realizaron en líquido en tiempo real. En este caso se llevaron a cabo las incubaciones de las matrices de palancas con las secuencias de DNA *ex situ* y se realizaron las medidas antes y después de la incubación en una cámara con control de humedad. La solvatación es crucial en la determinación tanto de la estructura como de la función de las moléculas biológicas y, concretamente, del DNA,⁹⁷ lo que motivó el estudio experimental de la interacción de las moléculas de agua con las monocapas autoensambladas de DNA mediante un sensor nanomecánico, que ha continuado en esta tesis. A elevadas densidades de inmovilización, y debido a la estructura de este polímero, se forman canales subnanométricos entre las moléculas de DNA de cadena sencilla (ssDNA, por sus siglas en inglés de *single-stranded DNA*) en los que se va intercalando el agua a medida que se hidrata la monocapa. En un ciclo de hidratación-deshidratación se diferencian varias fases. Al principio, de 0 a 20% de humedad relativa (HR) se genera una tensión positiva (forma cóncava de la palanca tomando como referencia el lado del DNA) en la palanca debido a las fuerzas de hidratación atractivas entre las moléculas de agua de las capas de solvatación del DNA. Al aumentar la HR (hasta un 70%) se aprecia una tensión negativa (forma convexa) debido al efecto repulsivo generado por los impedimentos estéricos entre las moléculas de agua que se superponen a las capas de solvatación. Por último (hasta un 100% de HR), vemos que ya no hay dependencia de la tensión con la humedad, debido a que el agua se va depositando por

encima de la capa de DNA. La tensión también varía en el ciclo de deshidratación, y el ciclo de hidratación/deshidratación presenta una gran histéresis (ver línea azul en Figura 1.10). Sorprendentemente, cuando la monocapa de DNA se encuentra hibridada (dsDNA, por sus siglas en inglés de *double-stranded DNA*) la respuesta es totalmente diferente. No aparece la tensión positiva de las etapas iniciales de la hidratación, toda la curva de hidratación genera tensión negativa, y el ciclo no presenta histéresis (ver línea roja en Figura 1.10). Los autores explican este fenómeno por la oclusión de los canales subnanométricos debida a la presencia de las hebras complementarias, que dificulta el acceso al agua.

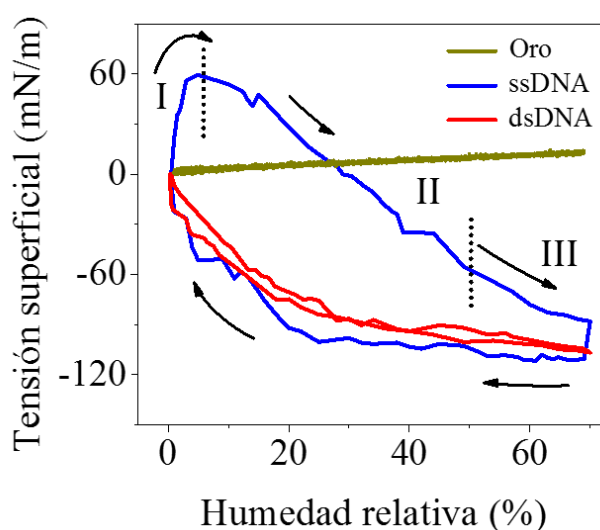


Figura 1.10 | Tensión superficial de micropalancas inducida por la hidratación de capas de DNA altamente empaquetadas. Tensión superficial generada por monocapas de DNA de cadena sencilla (ssDNA, línea azul) y DNA de cadena doble (dsDNA, línea roja) en función de la humedad relativa demostrada en el trabajo de Mertens et al.¹¹ I, II y III corresponden a las tres etapas diferenciadas en el proceso de hidratación del ssDNA.

La medida de la tensión generada en función de la humedad no sólo proporcionaba una huella de fuerzas moleculares para cada condición (DNA sencillo o doble) y abría la puerta al estudio del comportamiento del agua en estos sistemas, sino que proporcionaba una forma de amplificar las señales obtenidas. Mientras que en todos los trabajos anteriores las medidas de deflexión rondaban las decenas de nanómetros (equivalente para estas palancas a una tensión superficial de unos pocos mN/m, ver Apéndice: Calibración del sistema experimental) con una relación señal-ruido de $\sim 5 - 10$, en este caso se obtenían tensiones superficiales de más de 100 mN/m, con una relación señal/ruido de ~ 40 , lo que permitió alcanzar límites de detección en el rango fM. Además, la técnica permite la discriminación de una mutación única en las secuencias. Cabe destacar que esta capacidad de diferenciación entre dos secuencias que difieren en una base no se debe a la proporción de hebras que hibridan, ya que el ensayo se lleva a cabo a 24°C y la temperatura mínima necesaria de discriminación para estas secuencias es 43°C, sino a que la técnica es sensible a la diferencia de conformación del dúplex de DNA con y sin mutación. La clave de este comportamiento radica en la elevada densidad de inmovilización del DNA, que genera una monocapa de moléculas extendidas entre las cuales se forman canales de menos de 1 nm de diámetro.

En todos los trabajos mencionados hasta ahora la detección biológica se llevaba a cabo en modo estático, con un sistema de lectura de deflexión de haz y a temperatura ambiente, pero más recientemente se han propuesto otras aproximaciones. Con palancas de longitudes milimétricas y piezoeléctricas se ha llevado a cabo la detección en modo dinámico de secuencias de *Escherichia coli* O15H:H7 o *Lysteria monocytogenes* en muestras proteínicas con límites de detección que

equivalen a 700 células/mL aproximadamente.^{98,99} Es en estos trabajos cuando se realiza por primera vez la hibridación en un ensayo de detección a temperaturas superiores a 25°C (37 y 35°C respectivamente), aprovechándose la mejora en la especificidad aportada cuando las temperaturas de incubación tienen en cuenta las temperaturas de fusión de los oligonucleótidos implicados. También en modo dinámico, pero con una lectura piezorresistiva, Huang *et al.*¹⁰⁰ detectaron a concentraciones 1 pM secuencias relacionadas con el virus de la hepatitis B. También utilizando lectura piezorresistiva Xu *et al.*¹⁰¹ desarrollaron un método basado en la medida del cambio de masa debido a la pérdida del fragmento generado tras un corte con enzimas de restricción. Estas enzimas cortan el DNA de doble cadena en secuencias de reconocimiento específicas. En este trabajo se detectó una secuencia característica de *E. coli* O15H:H7 con un límite de detección de ~0.4 nM.

Por otra parte, también se han hecho esfuerzos enfocados a la investigación del origen y las causas de la tensión superficial generada en las palancas funcionalizadas con DNA. Los trabajos de Wu *et al.*,⁴⁸ Hansen *et al.*,⁴⁸ Stachowiak *et al.*¹⁰² y Zhang *et al.*¹⁰³ ponen de manifiesto, tras exhaustivos estudios acerca de la influencia de la longitud del DNA, la densidad de inmovilización, la posición de los desapareamientos y la eficiencia de hibridación en la deformación mecánica de las palancas, que el juego entre los cambios de entropía conformacional y las fuerzas intermoleculares producidas por interacciones específicas es clave en la generación de la tensión superficial. Una explicación más detallada aparecerá en el Capítulo 3, dada su importancia en la discusión de parte de los resultados obtenidos en esta tesis.

Capítulo 2

Materiales y Métodos

2.1 Secuencias de DNA

A la secuencia sintética que se inmoviliza sobre la palanca la llamamos sonda. A la secuencia complementaria que queremos detectar la llamamos diana. En esta tesis se han utilizado secuencias diana sintéticas y de origen celular. Todas las secuencias de DNA sintéticas utilizadas en esta tesis han sido adquiridas en Stab Vida (Portugal). Las secuencias obtenidas por extracción, y amplificación en los casos indicados, a partir de microorganismos han sido proporcionadas por el Dr. Jesús Mingorance (Departamento de Microbiología, Hospital Universitario La Paz, Madrid).

Las sondas utilizadas para formar las SAMs poseen un grupo tiol (-SH) en el extremo 3' que permite su anclaje a la superficie de oro de las palancas a través del enlace covalente oro – tiolato (RS-Au).⁹⁰ El grupo tiol y la secuencia de DNA se separan por un espaciador hidrocarbonado (C₃H₆) que facilita el empaquetamiento y aumenta la estabilidad de la SAM gracias a las interacciones hidrofóbicas intercatenarias.^{104,105} La secuencia de DNA presenta dos regiones (ver Figura 2.1): (i) cinco

timinas que se encuentran entre el espaciador C_3H_6 y (ii) la propia secuencia cuyo comportamiento e hibridación van a ser estudiados. El fragmento de timinas sirve para mantener la cadena alejada de la superficie, ya que la timina es la base que menor afinidad presenta por el oro. En trabajos anteriores se ha demostrado una mayor eficiencia de hibridación cuando las sondas de DNA se diseñan con esta configuración.¹⁰⁶

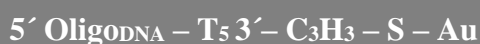


Figura 2.1 | Estructura de las sondas de DNA unidas al oro.

En la Tabla 2.1 se detallan las secuencias sintéticas utilizadas en cada capítulo, así como la función que han ejercido y el capítulo en el que se describe su utilización.

2.2 Reactivos

Tolueno, metanol, acetona, isopropanol, tampón tris-ácido etilendiaminotetraacético (Tris-EDTA), cloruro sódico (NaCl), citrato sódico salino 20x (SSC), ácido clorhídrico, dodecilsulfato sódico 10% (SDS), solución de prehibridación 2x, solución de hibridación *PerfectHyb Plus*, borohidruro sódico ($NaBH_4$), etanol y kit para la fabricación de polidimetilsiloxano (PDMS) de Sigma-Aldrich (España). Ácido sulfúrico (H_2SO_4) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) de *Panreac* (España). Las enzimas de restricción *FastDigest* AluI y *FastDigest* Hin6I fueron obtenidas de Thermo Fisher Scientific (España).

<i>Capítulo</i>	<i>Nombre</i>	<i>Tipo</i>	<i>Secuencia</i>
3	<i>Oligo1</i>	Sonda	5'-CAATGCAGATACACT TTTTT-C ₃ H ₆ -SH-3'
	<i>Oligo2</i>	Sonda	5'-GTCGGACTCAAGCTATCAC TTTTT-C ₃ H ₆ -SH-3'
	<i>ControlOligo3</i>	Sonda control (control negativo)	5'-GACCACCACAAGCTAACAC TTTTT-C ₃ H ₆ -SH-3'
	<i>ComplOligo1</i>	Diana (de Oligo1)	5'-AGTGTATCTGCATTG-3'
	<i>ComplOligo2</i>	Diana (de Oligo2)	5'-GTGATAGCTTGAGTCCGAC-3'
	<i>SecInterferente</i>	No relacionada	5'-GACACTGACATGCCA-3'
4	<i>ISsec</i>	Sonda	5'-GGTCTGCTACCCACAGCCGG TTTTT-C ₃ H ₆ -SH-3'
	<i>OligoControl</i>	Sonda control (control negativo)	5'-GTCGGACTCAAGCTATCAC TTTTT-C ₃ H ₆ -SH-3'
	<i>rpoB_mut531</i>	Sonda	5'-GCCGACTGTTGGCGCTGGG TTTTT-C ₃ H ₆ -SH-3'
	<i>rpoB_wt</i>	Sonda control (control negativo)	5'-GCCGACTGTCGGCGCTGGG TTTTT-C ₃ H ₆ -SH-3'
5	<i>Oligo1</i>	Sonda	5'-CAATGCAGATACACT TTTTT-C ₃ H ₆ -SH-3'
	<i>ComplOligo1</i>	Diana	5'-AGTGTATCTGCATTG-3'
6	<i>OXA48_s1</i>	Sonda	5'-ACATAAAATCACAGGGCGTAGTTGT GCTCTGTTTTT-C ₃ H ₆ -SH-3'
	<i>OXA48_s2</i>	Sonda	5'-AGGACATTTTCGGGCAATGTAGAC AGTTTCTTTTTT-C ₃ H ₆ -SH-3'
	<i>OXA48_s3</i>	Sonda	5'-GATGAATATGGATATGCCACATC GGATGGTTTTT-C ₃ H ₆ -SH-3'

Tabla 2.1 | Secuencias de DNA sintéticas utilizadas en la presente tesis.

2.3 Soluciones y tampones

Todos los tampones han sido preparados utilizando agua Milli Q (18,2 M Ω ·cm a 25° C). El tampón de inmovilización utilizado para funcionalizar las palancas con DNA consiste en TE 1x (Tris-HCl 10 mM, EDTA disódico 1 mM) con NaCl 1M a pH 7.5. Previamente a la funcionalización, con el objetivo de eliminar el oxígeno disuelto y minimizar así la oxidación de los grupos tiol, el tampón se desgasificó por sonicación y extracción simultánea del gas, mediante una bomba de vacío, durante 20 min. Las alícuotas de DNA se prepararon en tampón TE – NaCl 1M desgasificado y se mantuvieron a –20 °C hasta su utilización. Los tampones de lavado de baja y alta astringencia se prepararon al 0.1% de SDS en SSC 2x y 0.5x, respectivamente.

2.4 Funcionalización de la superficie

Las matrices de silicio fueron adquiridas de Concentris GmbH (Suiza) y de Micromotive GmbH (Alemania). Cada matriz consta de ocho micropalancas y está cubierta por una capa de oro de 20 nm, depositada sobre una capa de adhesión de cromo de 2 nm. Las palancas de Concentris miden 500 μ m de largo, 100 μ m de ancho y 1 μ m de espesor. Las palancas de Concentris miden 500 μ m de largo, 90 μ m de ancho y 1 μ m de espesor. En la Figura 2.2 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de una matriz adquirida de Concentris (a y b), una de las palancas de la misma (c), el detalle de una palanca vista de perfil (d), una palanca de Micromotive (e) y una matriz de Micromotive (f). Se aprecia en la imagen d) la capa de oro de 20 nm (indicada por una flecha) que cubre la superficie de silicio. Las matrices de Concentris se han utilizado en los Capítulos 3, 4 y 5; mientras

que las de Micromotive se emplearon en los experimentos del Capítulo 6.

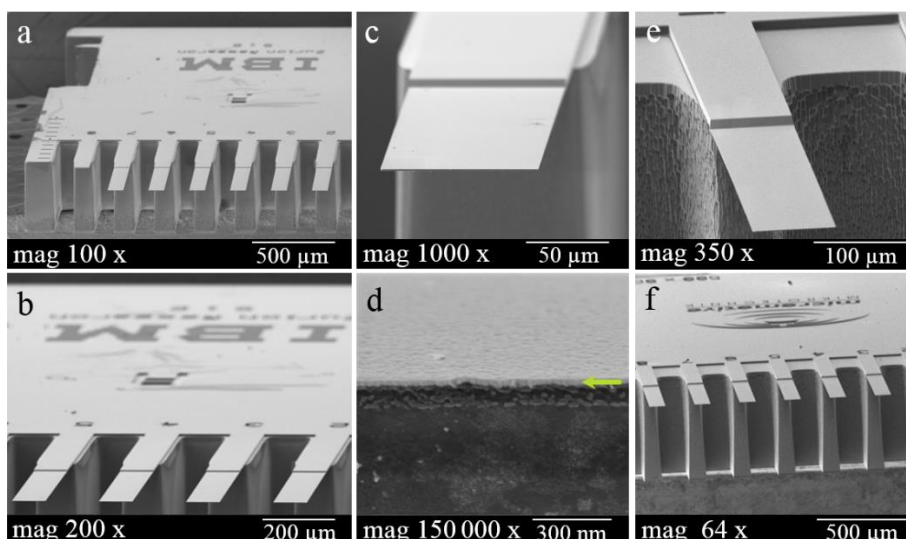


Figura 2.2 | Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de las matrices empleadas. a) Matriz de palancas de Concentris (C). **b)** Detalle de cuatro palancas (C). **c)** Detalle de una palanca (C). **d)** Detalle del perfil de una palanca (C). La flecha en d) señala la capa de oro de 20 nm que cubre la superficie de silicio. **e)** Una palanca de Micromotive (M). **f)** Una matriz de (M). Las palancas miden 500 μm de largo, 100 μm de ancho y 1 μm de espesor.

En primer lugar, las matrices fueron sometidas a dos procesos de limpieza consecutivos para eliminar los contaminantes orgánicos. Para los ensayos descritos en los Capítulos 3 y 4, las palancas se sumergieron en tolueno, metanol y agua Milli Q, se secaron bajo un flujo de nitrógeno seco y se mantuvieron durante 1 h en un limpiador de UV – ozono (Novascan, EEUU). En el caso de los Capítulos 5 y 6, las palancas se limpiaron con acetona y alcohol isopropílico, se secaron con nitrógeno seco y se irradiaron 1 h bajo el limpiador de UV – ozono.

Una vez limpia la superficie, se procedió a la funcionalización por inmersión en una solución con el correspondiente DNA tiolado a una concentración de 5 μM en tampón TE – NaCl 1M durante 24 h (Capítulos 3 y 4); a tiempos variables, 5, 120, 360, 540, 720, 1200, y 1440 min (Capítulo 5); o durante 2 h 15 min (Capítulo 6). En todos los casos, se llevó a cabo a 25 °C y bajo agitación en un termo-agitador (Eppendorf GmbH, Alemania). En este caso tenemos tantas matrices de palancas como secuencias de DNA queremos estudiar.

Tras el tiempo de inmovilización correspondiente las palancas se limpiaron con los mismos tampones de lavado que se utilizan tras la hibridación, de baja (5 min) y alta astringencia (20 min). Estos tampones contienen un tensioactivo aniónico, SDS, que ayuda a despegar el DNA fisisorbido de la superficie de las palancas. Finalmente, las matrices se aclararon con agua Milli Q durante 30 min. Todos los pasos se realizaron a 25 °C y bajo agitación.

2.4.1 Funcionalización mediante impresión por inyección

En el Capítulo 3 se describe la inmovilización alternativa de distintas secuencias en distintas palancas pertenecientes a una misma matriz. Esto se llevó a cabo mediante un equipo piezo-dispensador de líquido sin contacto que deposita gotas, cuyo volumen puede llegar a ser de picolitros, con una precisión de $< 5\mu\text{m}$ (*sciFLEXARRAYER*, Scienion GmbH, Alemania). Para evitar la contaminación cruzada entre palancas se inmovilizaron tres secuencias en palancas alternas, dejando una palanca en blanco entre dos funcionalizadas. La concentración inicial de todas las secuencias de DNA en los pocillos dispensadores fue de 20 μM ,

y se dispensó un volumen total de 42 nL en cada palanca. La temperatura de la plataforma sobre la que se disponen las matrices se mantuvo a 13 °C, para retardar la evaporación de las gotas depositadas. Una vez se hubieron secado las palancas, las matrices fueron incubadas en tampón TE-1M NaCl durante 24 h para permitir la reorganización de las SAMs de DNA. Los pasos posteriores (bloqueo e hibridación) se realizaron de la misma forma que en el caso de las matrices funcionalizadas por inmersión.

2.4.2 Funcionalización de superficies de silicio con oro

En el Capítulo 3 se describe la funcionalización de superficies de silicio cubiertas por oro con las mismas secuencias de DNA que las palancas para su inspección por microscopía de fuerzas atómicas (AFM). Las superficies de 5 mm² se recortaron de una oblea de silicio, se limpiaron en solución piraña (H₂SO₄:H₂O₂ 2:1), se aclararon con agua Milli Q y se secaron bajo nitrógeno seco. Una capa de oro de 20 nm fue depositada mediante evaporación por haz de electrones (*PicoSphere*, Oxford Vacuum Science Ltd, Reino Unido) sobre una capa de adhesión de cromo de 2 nm, a una velocidad de deposición de 0.02 nm s⁻¹. Las superficies cubiertas con oro se limpiaron con tolueno, metanol y agua Milli Q, y se irradiaron bajo UV – ozono durante 1 h. Con el objetivo de poder medir el espesor de las SAMs de DNA por AFM, se cubrió la mitad de las superficies con una cinta adhesiva de PVC (cloruro de polivinilo) de sala blanca (SPS-Europe, Holanda) para generar un escalón. La cinta se mantuvo firmemente unida mediante una pinza de teflón (ver Figura 2.3). Esta disposición se mantuvo durante todos los pasos hasta el momento de realizar las medidas en el AFM. El protocolo seguido para

la inmovilización del DNA es el mismo que se ha detallado para las matrices funcionalizadas por inmersión.

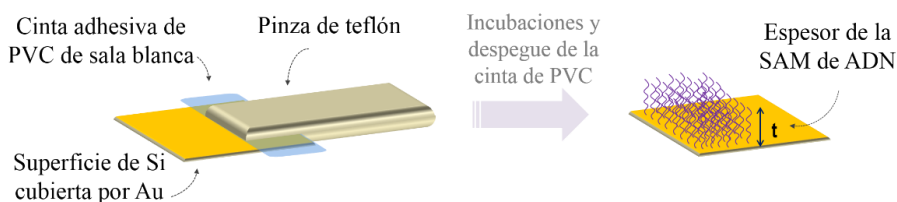


Figura 2.3 | Esquema del montaje de las superficies de silicio cubiertas por oro para su medida por AFM. La mitad de cada superficie de 5 mm² se cubrió con cinta de PVC de sala blanca y se sujetó firmemente mediante una pinza de teflón, generando un escalón al interactuar con el DNA sólo por la parte descubierta de cinta.

2.4.3 Bloqueo de la superficie

Al igual que ocurre en otros sensores basados en la inmovilización superficial de moléculas biológicas, el DNA forma capas heterogéneas¹⁰⁵ en las que aparecen espacios libres que, siempre que sea posible, deben ser bloqueados para evitar la adsorción inespecífica de moléculas a los mismos. El bloqueo previo a la hibridación fue realizado en todas las muestras correspondientes a los Capítulos 3 y 4 mediante su incubación en solución de pre-hibridación 1x (Sigma Aldrich) durante 30 min a la temperatura de hibridación, 30°C. El exceso de agentes bloqueantes se eliminó lavando las superficies en tampón SSC 1x durante 15 min a 25°C. Posteriormente, las muestras se aclararon con agua Milli Q.

2.5 Hibridación

2.5.1 Hibridación de oligonucleótidos para el estudio de la respuesta estática (Capítulo 3)

Las secuencias diana se diluyeron directamente a la concentración correspondiente en el tampón de hibridación *PerfectHyb Plus* (Sigma-Aldrich), agitándose vigorosamente para homogeneizar la solución. La solución de hibridación consistió en una mezcla 1:1:1 de las dos secuencias complementarias utilizadas en este estudio más una secuencia no complementaria. La hibridación se llevó a cabo a 30°C durante dos tiempos de incubación: 1 y 24 h, y a concentraciones finales de 30 y 300 nM. También se llevaron a cabo experimentos complementarios a un tiempo de incubación de 6 h. La temperatura de hibridación fue definida 7 – 15°C por debajo de la temperatura de todos los dúplex de DNA (37 – 45°C), según indica el fabricante del tampón de hibridación (Sigma-Aldrich). Esta temperatura nos permite aumentar la especificidad de la hibridación sin comprometer el enlace S-Au.^{107,108} Tras la hibridación, las muestras se lavaron con los tampones de lavado de baja (5 min) y alta astringencia (30 min) y se aclararon con agua Milli Q durante 30 minutos. El lavado de alta astringencia se llevó a cabo a la temperatura de hibridación (30°C), mientras que el de baja astringencia se llevó a cabo a 25°C. Todas las incubaciones se llevaron a cabo bajo agitación.

2.5.2 Hibridación de oligonucleótidos para el estudio de la respuesta dinámica (Capítulo 5)

La hibridación se llevó a cabo en tampón TE – NaCl 1M con la secuencia complementaria a una concentración de 1 μ M, a 25 °C y durante 24 h. En este caso, las condiciones fueron definidas con el objetivo de obtener la mayor proporción de hebras hibridadas posible.

2.5.3 Hibridación de amplicones, plásmidos y DNA genómico (Capítulos 4 y 6)

Las secuencias amplificadas por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y el DNA genómico (gDNA) y plasmídico fueron proporcionados por el Dr. Jesús Mingorance, del Departamento de Microbiología del Hospital La Paz (Madrid). Las concentraciones de todas las muestras proporcionadas se midieron con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) mediante la medida de su absorbancia a 260 nm (1 unidad de Abs_{260nm} equivale a 50 μ g/mL para DNA de doble cadena).

En el Capítulo 4 se describe la utilización de DNA procedente de aislados de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). La secuencia IS6110 se amplificó utilizando los oligonucleótidos descritos en Eisenach et al.¹⁰⁹ El amplicón generado tiene una longitud de 122 pares de bases (pb). Por otra parte, se extrajo y purificó el DNA genómico de un aislado sensible a rifampicina y otro resistente a dicho antibiótico. El gDNA de ambos aislados se digirió con el enzima de restricción *FastDigest* AluI (Thermo Fisher Scientific), que reconoce los sitios AG[^]CT y genera un fragmento

de 554 pb que contiene la secuencia IS6110 y otro de 586 pb que contiene el gen *rpoB*.

En el Capítulo 6 se describe la detección de plásmidos que contienen el gen *bla*_{OXA-48}, que codifica la carbapenemasa OXA-48, de *Klebsiella pneumoniae* (KP). En este caso se utilizaron tanto muestras de DNA plasmídico purificado, como lisados bacterianos que contenían gDNA y plásmidos, de aislados OXA⁺ y OXA⁻. Todas las muestras fueron digeridas con el enzima de restricción *FastDigest* Hin6I (Thermo Fisher Scientific), que reconoce los sitios G^ACGC y divide al gen en tres fragmentos de 200 – 300 pb cada uno.

Todas las digestiones enzimáticas se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones indicadas por el fabricante (Thermo Fisher Scientific).

Previamente a la hibridación, el DNA se desnaturalizó a 95 °C durante 5 min y se mantuvo en hielo 2 min. Después, se diluyó a la concentración y en el tampón de hibridación correspondientes (ver tabla 2) y se agitó vigorosamente para homogeneizar la solución. La hibridación se llevó a cabo a 30 °C. Tras la hibridación, las muestras se lavaron con los tampones de lavado de baja (L) y alta astringencia (H). La Tabla 2.2 resume las concentraciones de DNA, tiempo de hibridación, tampón de hibridación y tiempo de lavado tras la hibridación con cada tampón para cada muestra definida. Tras el lavado de alta astringencia, las muestras se aclararon con abundante agua Milli Q. El lavado de alta astringencia se llevó a cabo a la temperatura de hibridación (30 °C), mientras que el de baja astringencia se llevó a cabo a 25 °C.

Capítulo	Muestra	Concentración DNA	Tiempo hibridación	Tampón hib./ Tiempos lavados
4	Amplicón IS6110 de MTB	De 1 fg/mL a 10 ng/mL	1 h	<i>Perfect Hyb Plus</i> L 5 min; H 30 min
	gDNA de MTB	De 200 fg/mL a 20 ng/mL	1 h	<i>Perfect Hyb Plus</i> L 5 min; H 15 min
6	Plásmido purificado de KP	200 ng/mL	45 min	TE, NaCl 5mM L 5 min; H 15 min
	Lisado de KP	200 ng/mL	45 min	TE, NaCl 5mM L 5 min; H 15 min

Tabla 2.2 | Condiciones de hibridación. Concentraciones, tiempo de incubación y tiempos de lavados (de baja (L) y alta (H) astringencia) de las hibridaciones llevadas a cabo con el amplicón, gDNA y plásmidos de origen bacteriano.

2.6 Medida de las palancas en modo estático y dinámico

La lectura de las palancas se realiza por el método óptico de deflexión de haz, basado en la reflexión de un haz de luz sobre el extremo libre de la palanca que es recogido por un detector sensible a la posición.

Las matrices se colocan en una cámara ambiental termostatzada en la que se mantiene una temperatura de 25.00 ± 0.02 °C durante todas las medidas y se realizan ciclos de humedad, mediante el control de flujos de nitrógeno seco y húmedo, a una velocidad de $10.00 \pm 0.08\%$ min⁻¹. Antes de las medidas, las palancas se equilibran a una humedad relativa de 0%, generada mediante un flujo de nitrógeno seco, durante un tiempo mínimo de 10 min. La respuesta de cada palanca se mide tras la funcionalización y tras la hibridación. La mayor parte de las medidas ha sido realizada en un sistema de montaje propio manejado por el *software LabView* (National Instruments, EEUU), en el que las matrices se miden de una en una. Algunas medidas correspondientes al Capítulo 4 se han llevado a cabo en la plataforma *SCALA-Bio* (MecWins, España), basada en el mismo principio que el sistema descrito pero optimizada para el multiplexado.⁸⁸

Para las medidas de los Capítulos 3 y 4 se implementó un sistema de posicionamiento del haz láser mediante espejos retroalimentados. La respuesta de un PSD no es uniforme a lo largo de toda su superficie, por lo que cuando se mide la frecuencia de resonancia de una palanca que está sometida a procesos que inducen su deformación estática, el cambio de posición del punto láser sobre el PSD debido a esta deflexión genera cambios de frecuencia artefactuales. Para desacoplar ambas medidas y poder medir tanto la deflexión estática como la frecuencia de resonancia, simultáneamente y sin artefactos, hemos utilizado un sistema de posicionamiento del haz láser mencionado (Thorlabs GmbH, Alemania). La señal de salida del PSD se divide en dos señales, una retroalimenta los motores que mueven los espejos y la otra se analiza para obtener la frecuencia por un amplificador de bajo ruido con control de fase en lazo cerrado (PLL, por las siglas en inglés de *Phase Locked Loop*). El ángulo

de giro de los espejos se utiliza para calcular la deflexión estática de la palanca, mientras que la frecuencia de resonancia queda libre de artefactos.

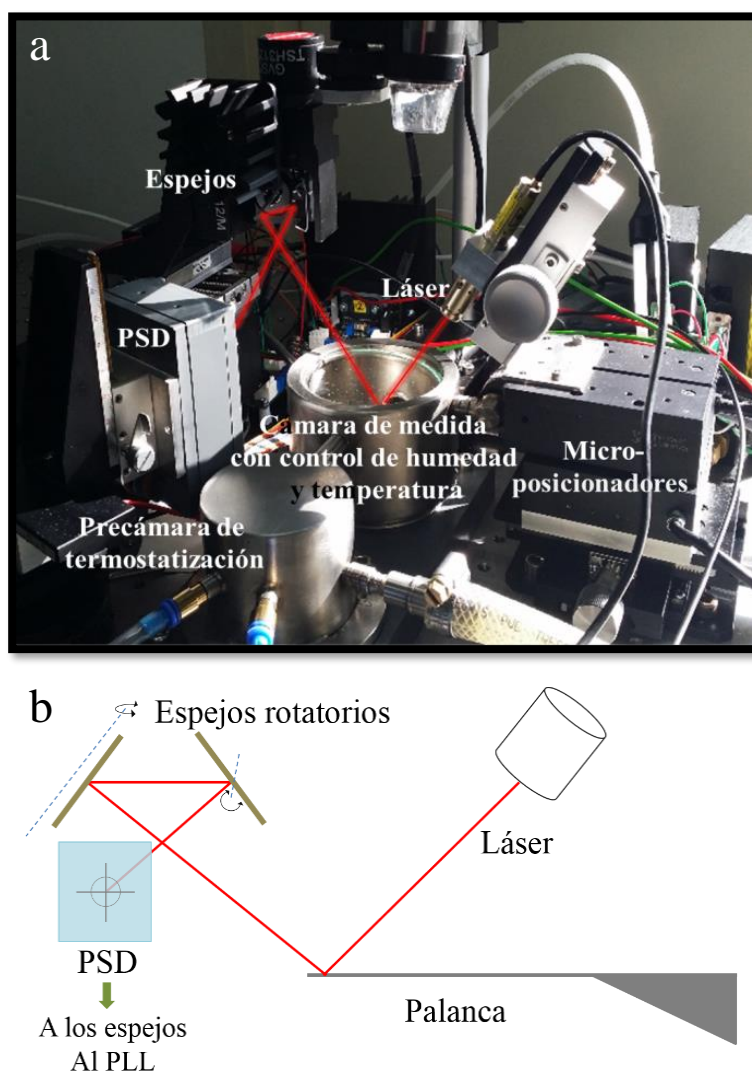


Figura 2.4 | Sistema de medida. Sistema experimental basado en la lectura por deflexión de haz utilizado para la medida de la deflexión estática y la frecuencia de resonancia de las palancas correspondientes a los Capítulos 3, 4, 5 y 6.

En la Figura 2.4 se muestra (a) una imagen del sistema experimental (incluyendo el sistema de espejos) con cada parte fundamental del mismo indicada, y (b) un esquema del sistema con los espejos.

El equipo comercial *SCALA-Bio* se utilizó para realizar algunas medidas correspondientes al Capítulo 4. En este caso, aparte de las medidas, también se trató de multiplexar el proceso de funcionalización e hibridación. Para ello se modificó una placa de 96 pocillos, cuya tapa se cubrió con una capa de polidimetilsiloxano (PDMS). A esta superficie se adhirieron las matrices y la base de la placa, que contiene los pocillos, se utilizó como tapadera. Sobre esta se realizaron pequeños agujeros para poder introducir las soluciones. Todas las incubaciones se llevaron a cabo en la placa a temperatura controlada y bajo agitación suave. Tras los lavados y el secado de las matrices, estas se midieron en el equipo *SCALA-Bio* directamente sobre la superficie de PDMS. En la Figura 2.5 se muestra una representación esquemática de todo el proceso seguido.

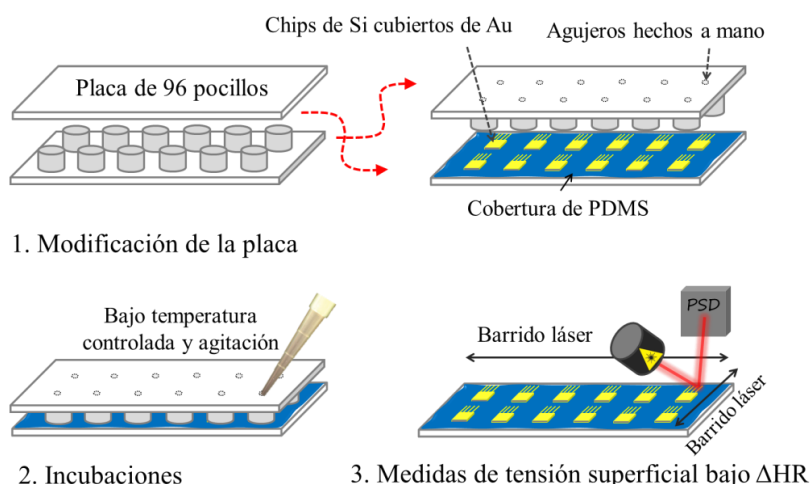


Figura 2.5 | Aproximación al multiplexado. Representación de los pasos seguidos para el multiplexado de la funcionalización e incubaciones de las

matrices sobre una placa de 96 pocillos modificada, así como su posterior medida en el equipo comercial *SCALA-Bio* (MecWins).

2.7 Medida del espesor de las capas de DNA por AFM

Como se ha mencionado en el apartado 2.4 “Funcionalización de la superficie”, en el Capítulo 3 se describe la utilización de superficies de silicio cubiertas por oro funcionalizadas con las mismas secuencias de DNA que las palancas para su medida por microscopía de fuerzas atómicas (AFM). Las medidas se realizaron con un AFM Multimodo de Bruker (España) con un controlador *Nanoscope V* y puntas de silicio altamente dopadas de 2 nm de radio y una constante elástica de 0.4 N/m. Para estudiar el espesor de las capas de DNA se utilizó el modo *Peak Force Tapping*TM y las imágenes fueron analizadas mediante el *software* de análisis *NanoScope*. El espesor se obtuvo por perfilado promedio y análisis de histogramas de las imágenes de topografía. La distancia medida de pico a pico del histograma corresponde al espesor de la capa. Las medidas y el análisis de las imágenes obtenidas fueron realizados por Guillermo Mokry en el Instituto de Microelectrónica de Madrid (CSIC).

Durante las medidas se montó una cámara con entrada y salida de nitrógeno seco y húmedo en torno al AFM para poder controlar la humedad relativa (HR). Las medidas se realizaron primero al 0% de HR tras una hora de estabilización bajo una atmósfera de nitrógeno seco. Después al 37% HR y de nuevo al 0% HR, para cada muestra. La variabilidad entre el espesor medido por primera vez a 0% HR y después,

tras la hidratación y deshidratación, a 0% HR de nuevo, estuvo siempre dentro del error de medida.

2.8 Reciclaje de las palancas

Las palancas se han reutilizado siguiendo un protocolo de reciclaje. En primer lugar, las muestras se sometieron a un tratamiento de plasma de O₂ durante 10 min con una potencia de 100 W para eliminar la materia orgánica. Después, los tioles se redujeron y separaron del oro mediante su incubación en una solución de NaBH₄ 0.5 M en H₂O:Etanol 1:1, según el protocolo descrito por Yuan *et al.*^{110,111} durante 2 h. Posteriormente, las matrices se aclararon con etanol y abundante agua Milli Q. Las palancas recicladas mediante este procedimiento han podido ser utilizadas con éxito, mostrando respuestas reproducibles, para su medida en modo estático. Sin embargo, la caracterización dinámica ha revelado la dificultad de obtener palancas que den respuestas similares a las dadas por las palancas originales, siendo muy complejo reproducir la densidad de inmovilización deseada.

Capítulo 3

Estudio de la respuesta estática de micropalancas con monocapas de DNA

3.1 Introducción

La unión entre la nanotecnología y la detección biológica basada en hibridación superficial de ácidos nucleicos ha demostrado un enorme potencial en el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico que permitan evitar los inconvenientes de los tradicionales.^{9,10,49} Sin embargo, hasta la fecha, el número de trabajos que ponen de manifiesto la reproducibilidad de la técnica con un gran número de medidas es muy limitado,⁵⁰ lo cual es necesario para dar el salto al campo del diagnóstico clínico. En el caso de los sensores nanomecánicos, son muchas las variables que influyen en la respuesta mecánica inducida por una SAM de DNA, siendo fundamentales las condiciones de inmovilización (pH, temperatura o fuerzas electrostáticas)^{23,48,103,112} y la nano-estructura del oro sobre la que se anclan las sondas de DNA,¹¹³⁻¹¹⁵ ya que pequeñas variaciones en estos parámetros pueden dar lugar a efectos mecánicos muy diferentes.^{116,117} Las condiciones citadas afectan, a la postre, a la

densidad superficial de cadenas de DNA, clave en el funcionamiento de estos sensores.^{92,104,105,118,119} Con el objetivo de mantener las sondas accesibles a la secuencia diana complementaria, a la vez que se mantiene una elevada densidad capaz de producir tensiones superficiales elevadas y, por tanto, transmitir grandes cambios en deflexión a la palanca, uno de los objetivos en el campo, común a otros sensores de DNA en superficie, ha sido la obtención de capas homogéneas y con las cadenas de ssDNA extendidas desde el punto de anclaje a la superficie.^{11,105} Algunas aproximaciones para conseguir este objetivo incluyen la utilización de métodos basados en nano-“injertos” altamente sofisticados¹²⁰⁻¹²² o la modificación de las superficies de oro, con el objetivo de obtener una rugosidad y carga superficial de las superficies muy específicas y difíciles de reproducir.^{112,113} Dado que las variaciones estructurales de las superficies, por mínimas que sean, pueden afectar enormemente al comportamiento mecánico de las capas, es necesario profundizar en el conocimiento acerca de las conformaciones y comportamientos de estas capas para poder controlar mejor el funcionamiento de estos sensores.¹²³ Además, para desarrollar aplicaciones finales de éxito, es necesario desarrollar protocolos de funcionalización que no requieran de la deposición de la capa de oro en un entorno de sala blanca inmediatamente antes del anclaje de las moléculas biológicas, como se ha realizado hasta ahora.⁸⁻¹¹ Es decir, las matrices de palancas de silicio/oro han de poder almacenarse hasta su funcionalización y uso en cualquier laboratorio y en condiciones asequibles por los usuarios finales a los que van dirigidas las aplicaciones.

3.2 Estudio de la tensión superficial inducida por la hidratación de SAMs de DNA ancladas a micropalancas

En este capítulo se describe el estudio de la respuesta mecánica estática de micropalancas funcionalizadas con SAMs de DNA en función de la hidratación y deshidratación de las mismas. En primer lugar, se ha estudiado el comportamiento de las capas formadas por moléculas de cadena sencilla (ssDNA). A continuación, se ha evaluado el efecto de la incubación de estas sondas con las secuencias complementarias en diferentes condiciones (dos tiempos de incubación y dos concentraciones de secuencia diana). Las secuencias de DNA utilizadas en este estudio se muestran en la Tabla 3.1.

<i>Nombre</i>	<i>Tipo</i>	<i>Secuencia de DNA</i>
<i>Oligo1</i>	Sonda	5'-CAATGCAGATACACTTTTT-C ₃ H ₆ -SH-3'
<i>Oligo2</i>	Sonda	5'-GTCGGACTCAAGCTATCACTTTTT-C ₃ H ₆ -SH-3'
<i>ControlOligo3</i>	Sonda control (control negativo)	5'-GACCACCACAAGCTAACACTTTTT-C ₃ H ₆ -SH-3'
<i>ComplOligo1</i>	Diana	5'-AGTGTATCTGCATTG-3'
<i>ComplOligo2</i>	Diana	5'-GTGATAGCTTGAGTCCGAC-3'
<i>SecInterferente</i>	Secuencia no relacionada	5'-GACACTGACATGCCA-3'

Tabla 3.1 | Secuencias de DNA empleadas en el presente estudio.

Se han realizado dos tipos de experimentos, ilustrados en la Figura 3.1. En uno de ellos (I en la Figura 3.1) se han funcionalizado grupos de tres matrices, cada una con ocho micropalancas, con tres secuencias distintas (Oligo1, Oligo2 y ControlOligo3). Cada matriz ha sido incubada en un pocillo con una de las tres secuencias. Tras la funcionalización se ha medido la respuesta mecánica en función de la humedad relativa (HR). A continuación, se ha llevado a cabo la

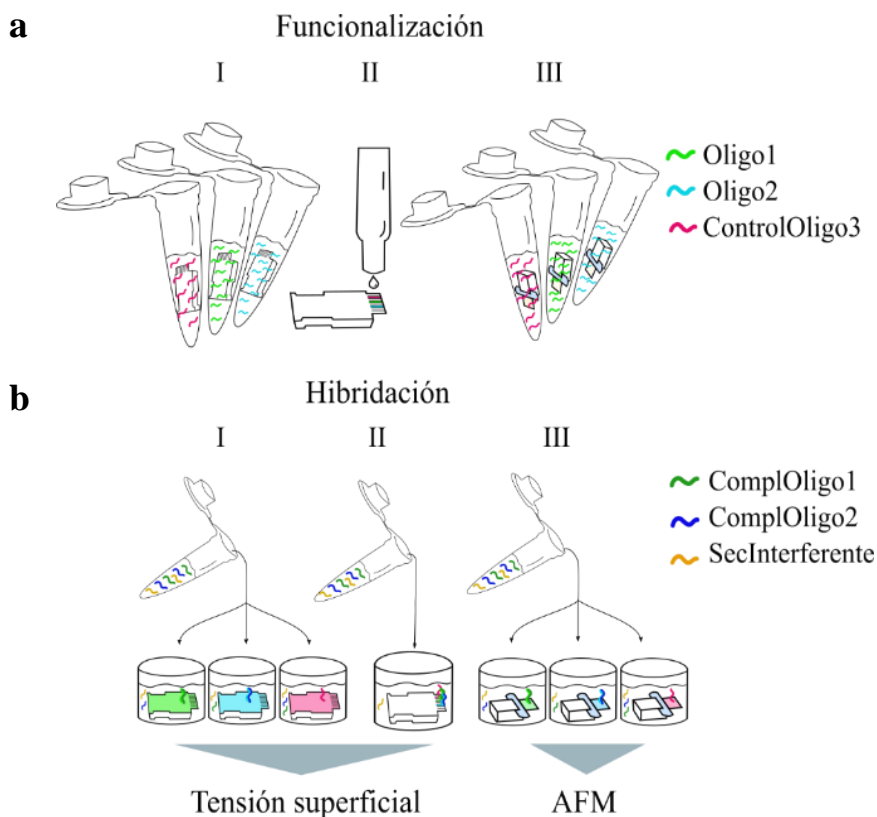


Figura 3.1 | Tipos de experimentos realizados para el estudio de la tensión superficial inducida por la hidratación de las SAMs de DNA.

a) Funcionalización: **I)** Las matrices se funcionalizan por inmersión en pocillos. Hay tantas matrices como secuencias a estudiar. **II)** En cada matriz se funcionalizan tres palancas alternas mediante un piezo-dispensador, cada una con una de las tres secuencias. Hay una matriz con las tres secuencias a estudiar. **III)** Superficies de 5 mm² se funcionalizan por inmersión de forma paralela a las matrices en (I). **b) Hibridación:** la hibridación se lleva a cabo de la misma manera para todas las muestras (**I, II y III**): la matriz o superficie se incubaba en una solución que contiene una mezcla 1:1:1 de las secuencias complementarias a Oligo1 y Oligo2, ComplOligo1 y ComplOligo2, y una secuencia no relacionada que puede interferir en la hibridación de las compl, SecInterferente. En cada caso hibridan las secuencias correspondientes.

incubación de todas las matrices en una solución que contiene las secuencias complementarias a Oligo1 y Oligo2 (ComplOligo1 y ComplOligo2) y una secuencia aleatoria no complementaria a ninguna de las tres empleadas en la funcionalización que podría interferir en la hibridación de las complementarias debido a su hibridación inespecífica con las sondas, llamada SecInterferente. ControlOligo3 actúa como control negativo, ya que no es complementaria a ninguna de las secuencias diana. Oligo2 y ControlOligo3 difieren únicamente en seis bases (ver Tabla 3.1). Para esta incubación se ha utilizado el tampón de hibridación *PerfectHyb Plus* de Sigma-Aldrich, optimizado para proveer la máxima señal minimizando el ruido de fondo. La temperatura de hibridación fue definida 7 – 15 °C por debajo de la temperatura de todos los dúplex de DNA (37 – 45 °C), según indica el fabricante del tampón de hibridación (Sigma-Aldrich). Esta temperatura nos permite aumentar la especificidad de la hibridación sin comprometer el enlace S-Au.^{107,108} Es sabido que el enlace S-Au se oxida en aire y en agua,^{89,124-126} por lo que una temperatura elevada favorece la oxidación y desorción de la SAM del oro. La tensión superficial frente a la HR ha sido medida de nuevo tras la hibridación. Dado que la respuesta de cada palanca se mide antes y después de la hibridación, cada palanca está auto-referenciada, lo que elimina posibles artefactos en la respuesta entre palancas debidos a las diferentes propiedades mecánicas de las mismas.

En el segundo tipo de experimentos (II en Figura 3.1), y como prueba de concepto de un sensor capaz de detección múltiple simultánea, la inmovilización de las tres secuencias se ha llevado a cabo mediante un piezo-dispensador (*sciFLEXARRAYER*, Scienion) con el que se han depositado las secuencias en palancas alternas dentro de una misma

matriz. La hibridación se ha realizado como se ha descrito en el caso anterior.

El estudio de la tensión superficial se ha complementado con el análisis del efecto de la hidratación sobre el espesor de las capas. Para ello se han preparado superficies de 5 mm² de silicio cubiertas de oro y se han funcionalizado e hibridado en paralelo (III en Figura 3.1) siguiendo el protocolo descrito para las matrices que se funcionalizan por inmersión (I en Figura 3.1). La particularidad de estas superficies es que la funcionalización genera un escalón dado por la frontera precisa entre zonas inmovilizadas y zonas sin DNA (ver Materiales y métodos), que nos permite medir el espesor de la monocapa de DNA por AFM. A partir de los perfiles medidos del escalón en la frontera entre la monocapa de DNA y la superficie de oro (Figura 3.2 a)) se obtuvieron histogramas, cuyo análisis permitió calcular el espesor de dichas capas. La distancia medida de pico a pico del histograma corresponde al espesor de la capa (Figura 3.2 b)). Las medidas se realizaron primero al 0% HR, después al 37% HR y de nuevo al 0% HR, para cada muestra. La variabilidad entre los espesores medidos al 0% antes y después de hidratar las capas está dentro del error de medida. La caracterización experimental del efecto de la hidratación sobre el espesor de las capas se ha complementado por simulaciones de dinámica molecular*, realizadas por Jesús I. Mendieta, del grupo de Modelado Molecular del CBMSO (CSIC-UAM).^{127,128}

La simulación computacional basada en **dinámica molecular* es una herramienta para el estudio de sistemas complejos de la materia. Esta técnica permite calcular las trayectorias de los átomos o moléculas que forman la materia cuando interaccionan entre sí durante un período determinado de tiempo, lo que permite simular el comportamiento microscópico del sistema.¹²⁷

3.2.1 Tensión superficial generada por SAMs de ssDNA

El espesor medio de las capas de ssDNA medido por AFM (Figura 3.2) está en torno a 1.4 nm, lo que nos indica que en estas micropalancas comerciales y con los protocolos de funcionalización seguidos, las hebras de ssDNA se encuentran en una conformación tumbada o colapsada cuando las superficies se encuentran en aire a humedad relativa ambiente, ya que la longitud teórica de las hebras extendidas y en disolución es 6 nm aproximadamente.

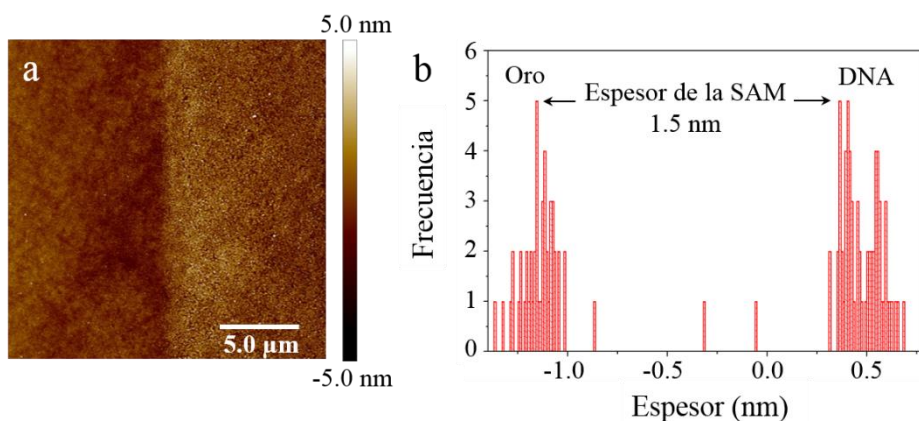


Figura 3.2 | Medida del espesor de la capa de DNA por AFM. a) Imagen obtenida por AFM en modo *Peak Force Tapping*TM de la topografía de una superficie de silicio/oro tras la inmovilización localizada de DNA. b) Ejemplo de un histograma obtenido a partir de los perfiles del escalón medidos por AFM en la frontera entre la monocapa de DNA y la superficie de oro. La distancia medida de pico a pico corresponde al espesor de la capa.

La Figura 3.3 muestra la variación de tensión superficial (σ) con la humedad relativa (HR) de 40 micropalancas funcionalizadas con la secuencia Oligo1 (ver Tabla 3.1). Estas 40 micropalancas forman parte

de cinco matrices funcionalizadas independientemente, como se ha detallado anteriormente (estrategia I en Figura 3.1). Como se puede apreciar, las monocapas de ssDNA muestran un patrón de tensión superficial debido a la hidratación y deshidratación muy reproducible.

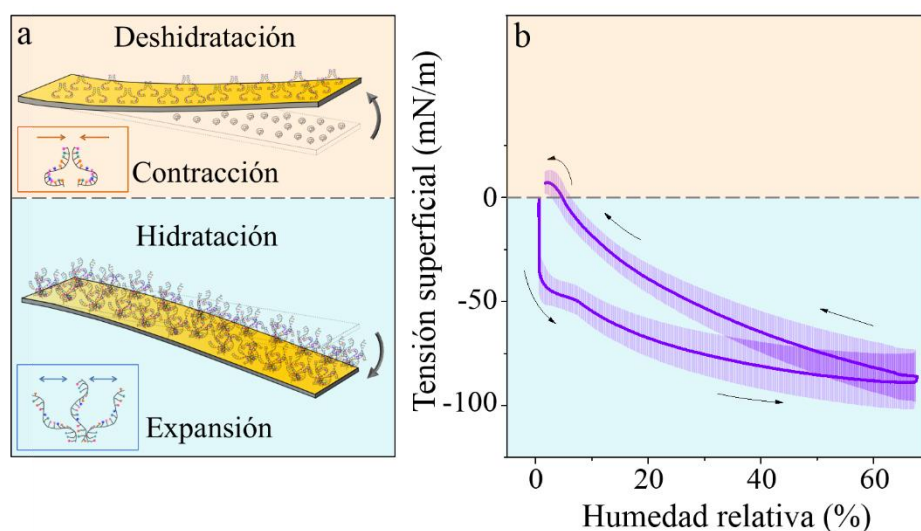


Figura 3.3 | Tensión superficial de una micropalanca funcionalizada con ssDNA en función de la humedad relativa. (a) Representación de la expansión y contracción de la monocapa de ssDNA anclada a la superficie de una palanca debidas al cambio de humedad relativa. **(b)** Variación de la tensión superficial de las palancas funcionalizadas con ssDNA (secuencia Oligo1). El área sombreada representa la desviación estándar de las curvas de tensión superficial medidas en 40 micropalancas, pertenecientes a 5 matrices funcionalizadas de forma independiente.

En primer lugar, vemos un aumento de la tensión compresiva a medida que la HR aumenta de 0 al 70%. Atribuimos esta tensión al hinchamiento de la capa formada por el polielectrolito.¹¹⁷ Esta suposición se apoya en las medidas experimentales por AFM y las

simulaciones de dinámica molecular, que muestran un aumento del espesor medio de las capas de ssDNA con la hidratación. La variación de espesor medido por AFM es de $\Delta t = 0.230 \pm 0.035 \text{ nm}$. La comparación entre los estados totalmente húmedo y seco se puede ver en la Figura 3.4, apreciándose un aumento claro del espesor con el aumento de humedad. El DNA es altamente hidrofílico. De hecho, la deshidratación favorece la transición de la conformación del DNA fisiológica, B, a la conformación A para economizar el uso de las moléculas de agua en una situación de baja humedad relativa. Mientras que en la conformación B cada fosfato cuenta con una capa de solvatación independiente, en la conformación A los fosfatos comparten las moléculas de agua.^{129,130} Al aumentar la humedad, la longitud de persistencia* del DNA disminuye (en solución $lp_{ssDNA} \sim 0.75 \text{ nm}$, equivalente a 2 nucleótidos; en aire $lp_{ssDNA} \sim 40 \text{ nm}$, equivalente a 120 nucleótidos)^{131,132} y cada cadena tiende a adoptar la conformación que le permite maximizar su entropía. Sin embargo, las interacciones intermoleculares derivadas del anclaje a una superficie junto a otras moléculas afectan a dicha conformación.⁴⁸ Si la densidad de inmovilización es lo suficientemente alta, cada cadena de DNA se verá obligada a ocupar un espacio conformacional menor que al que tiende de forma natural debido a las repulsiones estéricas o electrostáticas. Esta deformación reduce la entropía conformacional de cada hebra y genera lo que llamamos una penalización entrópica. Esta penalización es

La *longitud de persistencia es una propiedad mecánica de los polímeros que permite cuantificar su rigidez. Se refiere a longitud máxima de la cadena de un polímero que permanece en una dirección particular sin doblarse.¹³² Cuanto menor sea la longitud de persistencia de un polímero, más flexible es.

compensada por la deflexión compresiva de la palanca.⁴⁸ El aumento de superficie generado con la curvatura permite a cada hebra ocupar un espacio conformacional más amplio.

Cuando la HR disminuye desde el 70 al 0%, la monocapa se deshidrata y se contrae, lo que conlleva la disminución de la tensión compresiva generada con la hidratación. Como podemos ver en la Figura 3.3 b), la curva presenta histéresis. Esto significa que durante el ciclo de hidratación/deshidratación parte de la energía es disipada, probablemente en forma de calor, lo cual quiere decir que el trabajo requerido para hidratar la capa es menor que el necesario para deshidratarla. Se trata de un efecto bien documentado durante la hidratación y deshidratación de otros materiales tan diversos como polímeros utilizados para la fabricación de lentillas¹³³ o la tierra del suelo.¹³⁴ Durante la deshidratación, observamos un pico de tensión positiva cuando se alcanza un valor de humedad entre el 2-3 %. Atribuimos este pico a la dominancia de las fuerzas de hidratación sobre las fuerzas generadas por la entropía conformacional.^{55,116,135} Simulaciones de dinámica molecular corroboran que en este punto las cadenas de DNA tienden a compartir las pocas moléculas de agua que quedan en la capa, lo que induce fuerzas intercatenarias atractivas que dan lugar a este pico de tensión superficial positiva. Al 0% de humedad relativa la capa vuelve a adoptar una conformación más relajada.

El balance de fuerzas implicadas en la hidratación y deshidratación del DNA, y su efecto sobre la deflexión de las palancas, son muy complejos, siendo los puentes de hidrógeno una de las interacciones no covalentes más relevantes que gobiernan el comportamiento de la SAM.^{55,136} Las dinámicas de hidratación y deshidratación, que rigen

tanto el signo como la magnitud de la respuesta estática de las palancas dependen de la contribución de las fuerzas de hidratación y de entropía conformacional. La dominancia de unas sobre las otras depende en gran medida de la densidad inicial y la conformación de la monocapa estudiada.⁵⁵ En los presentes experimentos estimamos una densidad superficial en el rango de $2.5 - 3.5 \times 10^{13} \text{ moléculas/cm}^2$ basándonos en medidas de XPS (Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X) de muestras patrón obtenidas en condiciones de inmovilización controladas.

No consideramos el efecto de las interacciones electrostáticas, ya que en trabajos anteriores^{11,117} se ha demostrado que la respuesta generada por moléculas de ácido péptidonucleico* no es diferente de la que provoca el DNA, lo que nos permite descartar el efecto electrostático. Es necesario destacar que durante el ciclo de humedad al que se somete a las capas no se alcanza un estado de equilibrio, dadas la velocidad de cambio de la humedad relativa ($10.00 \pm 0.08\% \text{ min}^{-1}$) y las cinéticas de cambios conformacionales de las capas de DNA, que pueden alcanzar el rango de las horas.^{137,138}

Las curvas de tensión superficial no difieren de forma significativa entre las dos secuencias estudiadas (Oligo1 y Oligo2), a pesar de su diferente longitud (4 bases) y composición (11 % GC aproximadamente). Es probable que la variación de tensión superficial que cabría esperar debido a la diferente longitud de las cadenas⁴⁸ quede camuflada por el efecto de variaciones en la densidad superficial.

El **ácido péptidonucleico* es un polímero sintético que mimetiza al DNA en el cual el esqueleto de azúcar – fosfato se ha sustituido por un esqueleto aminoacídico. Presenta la peculiaridad de no estar cargado electrostáticamente.

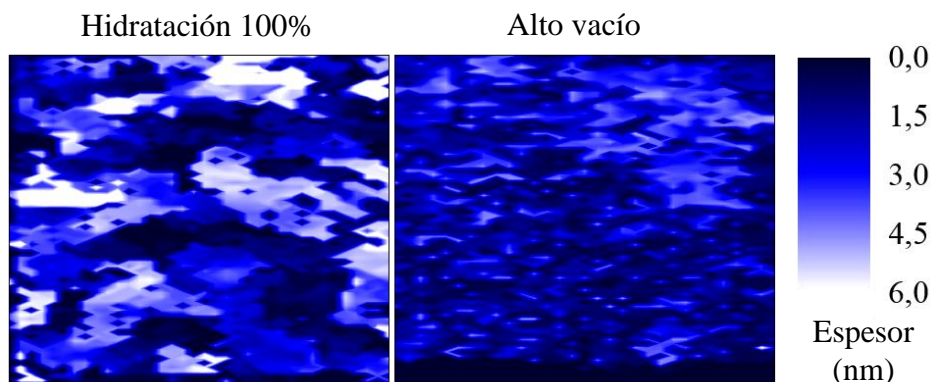


Figura 3.4 | Resultado de la simulación de dinámica molecular de las capas de ssDNA en función de la humedad relativa. La comparación entre los estados totalmente hidratado (izquierda) y seco (izquierda), nos indica claramente que la presencia de moléculas de agua estira las moléculas de DNA, produciendo un aumento del espesor de la monocapa. Se muestran las imágenes correspondientes a una celda de simulación de $16 \times 8 \text{ nm}^2$. La densidad superficial simulada es de $3.9 \times 10^{13} \text{ moléculas/cm}^2$.

3.2.2 Patrones de hibridación

Una SAM de ssDNA que no presenta una densidad de moléculas superficial lo suficientemente elevada como para que las cadenas se mantengan extendidas desde el anclaje incluso a humedad relativa ambiente no suele considerarse idónea para el desarrollo de un sensor nanomecánico. Sin embargo, la conformación en la que el ssDNA está tumbado o colapsado es la más habitual experimentalmente y, como hemos visto, es posible obtener capas altamente reproducibles, por lo que se procedió a su evaluación para la detección de oligonucleótidos. Para ello, estudiamos la respuesta estática generada con los ciclos de hidratación/deshidratación de micropalancas funcionalizadas con Oligo1, Oligo2 y ControlOligo3 (utilizado como control negativo) e incubadas con las secuencias complementarias a diferentes

concentraciones de secuencia diana y durante distintos tiempos de incubación. En la Figura 3.5 podemos ver los distintos patrones de tensión superficial que hemos encontrado en función de las condiciones de hibridación. Cada fila en la gráfica corresponde a una de las sondas (Oligo1, Oligo2 o ControlOligo3), mientras que las columnas se refieren a los tiempos de incubación con las secuencias complementarias (izquierda: 1 h; derecha: 24 h). En todos los casos la concentración de las secuencias diana en la solución ha sido 300 nM. Para simplificar el análisis, nos centraremos a partir de ahora solo en la curva de hidratación.

Tras la incubación de las palancas funcionalizadas con la secuencia ControlOligo3 (sonda control) en la solución que no contiene secuencias complementarias a esta sonda, no observamos ningún cambio en el patrón de tensión superficial (ver Figura 3.5 a) y b)). Hemos etiquetado este patrón de tensión superficial invariable como A.

Tras la incubación de las palancas funcionalizadas con la sonda **Oligo1** en la solución que contiene la secuencia complementaria ComplOligo1 a una concentración de 300 nM observamos dos patrones distintos dependiendo del tiempo de hibridación. **(1)** Cuando el tiempo de incubación se limita a **1 h**, vemos un aumento de la tensión superficial con la hidratación respecto del ssDNA (Figura 3.5 c)). Hemos etiquetado esta respuesta como B. Pensamos que este comportamiento se debe a que la hibridación ha ocurrido parcialmente en la mayor parte de cadenas implicadas. Es bien sabido que, en solución, la formación de la doble hélice comprende dos etapas: (i) la nucleación (formación inicial de 2 – 5 pares de bases), y (ii) la propagación (o “cierre en cremallera”), es decir, el emparejamiento secuencial de la molécula completa.^{21,139,140}

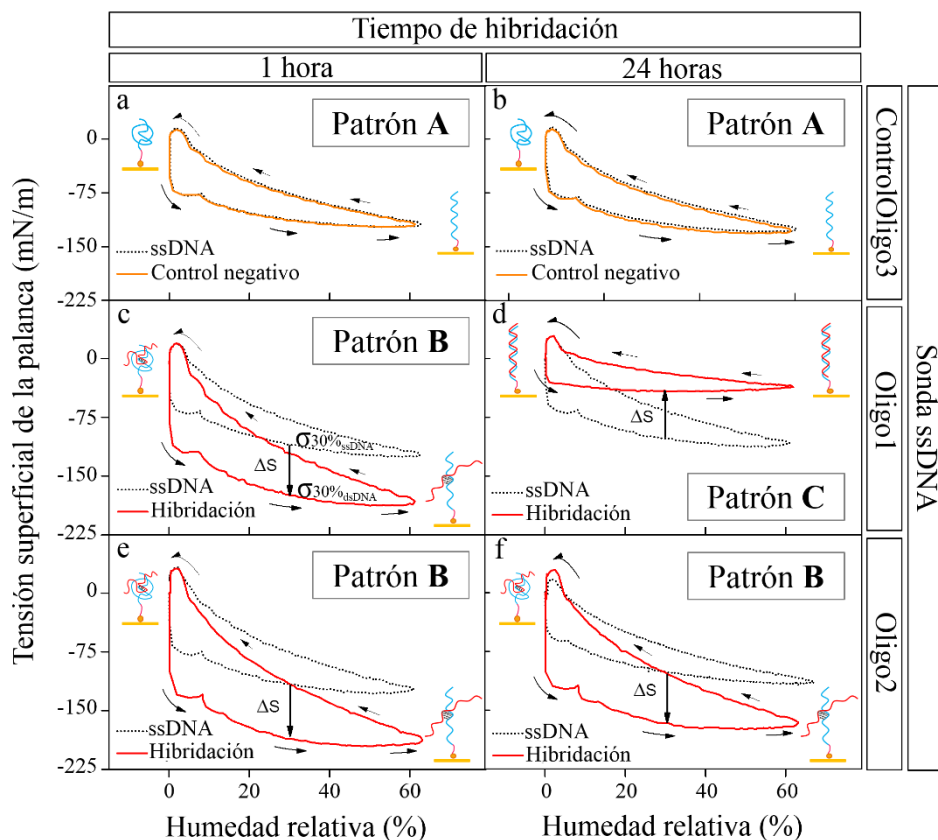


Figura 3.5 | Patrones de tensión superficial inducida por la hidratación en función de las condiciones de hibridación. **a)** Curva representativa de tensión superficial en función de la HR de las palancas funcionalizadas con ControlOligo3 antes (línea negra punteada) y después (línea naranja sólida) de ser incubadas durante 1 h y **b)** 24 h con la solución que no contiene secuencias complementarias a esta sonda. A este patrón lo hemos llamado A. **c)** Curva representativa de tensión superficial en función de la HR antes (línea negra punteada) y después (línea roja sólida) de la incubación durante 1 h y **d)** 24 h de las palancas funcionalizadas con Oligo1 con la solución que contiene la secuencia complementaria ComplOligo1 a una concentración de 300 nM. En c) la tensión superficial con la HR aumenta tras la hibridación. A este patrón lo hemos llamado B. En d) la tensión superficial con la hidratación disminuye y se aplana tras la hibridación. A este patrón lo hemos llamado C. **e)** Curva

representativa de tensión superficial en función de la HR antes (línea negra punteada) y después (línea roja sólida) de la incubación durante 1 h y f) 24 h de las palancas funcionalizadas con Oligo2 con la solución que contiene la secuencia complementaria ComplOligo2 a una concentración de 300 nM. Las palancas funcionalizadas con Oligo2 muestran el patrón B incluso tras la incubación de 24 h, lo que sugiere una dependencia de la cinética de hibridación. Las representaciones mostradas junto a las curvas ilustran la hipótesis acerca de los cambios conformacionales que dan lugar a cada patrón.

Sin embargo, la asociación de las cadenas durante la hibridación en superficies procede a través de un mayor número de estados intermediarios, demostrados teóricamente por simulaciones de dinámica molecular.^{17,141,142} Para completar la hibridación desde un estado de nucleación, las hebras deben deslizarse una sobre la otra en búsqueda del alineamiento correcto, siendo posible incluso giros de la cadena complementaria.^{17,142} Se cree que esta reorientación es la responsable de los mínimos de energía locales que generan estados de transición metaestables, no presentes durante la hibridación en solución. En solución el proceso es más favorable dado que ambas hebras tienen libertad de rotación en torno a los puntos de nucleación iniciales.¹⁷ La existencia de un estado de hibridación parcial duradero durante la formación del dúplex ya había sido hipotetizada a la vista de los resultados termodinámicos obtenidos en trabajos anteriores a la demostración teórica de estos estados.¹⁴³ Estos mínimos energéticos generados cuando una de las dos cadenas se encuentra anclada a una superficie implican, además, la mayor estabilidad de los dúplex de DNA formados en superficie vs. en solución demostrada también teóricamente.¹⁴² Medalion *et al.* plantean que el aumento del tiempo de

apareamiento durante la hibridación en monocapas de DNA ancladas a superficies puede deberse a la obstaculización de la difusión de las secuencias diana a través de redes formadas por hibridación cruzada de las sondas.¹⁴⁴ Este efecto también podría afectar a la menor eficiencia de hibridación, pero mayor estabilidad de los dúplex formados por los oligonucleótidos anclados.^{142,145} Todo esto explicaría la ralentización de las cinéticas de hibridación debido al anclaje a la superficie,¹⁴⁶ hasta tres órdenes de magnitud demostrada por Sekar *et al.*¹⁴⁵ Los resultados obtenidos en esta tesis concuerdan con estos estudios. Las secuencias complementarias y parcialmente hibridadas en la monocapa formarían estos estados de transición que implicarían un mayor coste entrópico, debido a que al no haber hibridado completamente todavía tienen una longitud de persistencia baja. Además, debido a la hibridación el número de moléculas por unidad de superficie aumenta respecto a la micropalanca sin interacción con las hebras complementarias. Esto supondría un cambio de tensión superficial mayor al hidratarse la monocapa de DNA con respecto a la respuesta de la capa formada por la sonda.

(2) Cuando la incubación con las cadenas complementarias se lleva a cabo durante **24 h**, lo que encontramos es que la tensión superficial generada con la hidratación se reduce en gran medida, en comparación con la respuesta que da la capa de ssDNA. A este patrón lo hemos llamado C (ver Figura 3.5 d)). El dsDNA tiene una longitud de persistencia mucho mayor que las moléculas de ssDNA (en solución $lp_{dsDNA} \sim 50 \text{ nm}$, equivalente a 150 pb; $lp_{ssDNA} \sim 0.75 \text{ nm}$, equivalente a 2 nucleótidos).^{48,147,148} Si suponemos que la hibridación ha sido completa en la mayor parte de hebras implicadas, dada la diferencia en la longitud de persistencia y la corta longitud de los oligonucleótidos

implicados en el estudio, cabe esperar una mínima expansión de la monocapa de dsDNA debida a la hidratación.⁴⁸ Este comportamiento se ha observado únicamente para la secuencia Oligo1 tras incubación de 24 h con su complementaria ComplOligo1 a 300 nM.

Sorprendentemente, la mayor parte de matrices funcionalizadas con la secuencia **Oligo2** mostraron el patrón B tanto tras la incubación con la secuencia complementaria ComplOligo2 a 300 nM de 1 h como de 24 h (ver Figura 3.5 f)). Atribuimos este comportamiento a que la secuencia Oligo2 presenta una cinética de hibridación más lenta que Oligo1 en las condiciones de hibridación del presente estudio. Es conocido en la literatura científica que la cinética de hibridación depende de múltiples factores, como la longitud de la secuencia, la composición de bases o los efectos competitivos entre diferentes secuencias diana.¹⁴⁹⁻¹⁵² Una diferencia de 4 bases demostró recientemente una diferencia del 80% en la señal de hibridación a los 3 min de comenzar la reacción.¹⁵² Incluso secuencias diseñadas con temperaturas de fusión similares pueden llegar a tener cinéticas de hibridación que difieran en un orden de magnitud cuando las sondas se encuentran inmovilizadas en superficies¹⁴⁵ y en el proceso de hibridación están implicadas varias secuencias diana.¹⁵⁰ Por otra parte, además de las variaciones debidas a la longitud o composición de las secuencias, no podemos ignorar otras fuentes de variabilidad en las cinéticas de hibridación, como las variaciones en la densidad de inmovilización,^{19,55,153-155} el hacinamiento molecular¹⁹ o el entrecruzamiento entre cadenas,¹⁴⁴ también dependientes de la secuencia y que no hemos podido controlar en este estudio. En general, las estimaciones para la hibridación de secuencias en solución no son aplicables a la hibridación en superficie.

Esto tiene implicaciones importantes cuando se pretende cuantificar la concentración de ácidos nucleicos en una muestra. Cuando utilizamos métodos basados en hibridación en superficie, a menos que se alcance el equilibrio a tiempos de incubación muy largos o las cinéticas de hibridación de cada secuencia se conozcan perfectamente y se tengan en cuenta, la cuantificación de secuencias diana en una muestra desconocida resulta imposible.¹⁴⁵ En este sentido, la metodología presentada en esta tesis comparte el desafío mencionado con tecnologías más maduras como los *microarrays* de DNA basados en fluorescencia,¹⁷ como discutiremos más adelante.

3.2.2.1 Disminución de la velocidad de hibridación

Para demostrar la consistencia de nuestras suposiciones hemos disminuido un orden de magnitud la concentración de secuencia diana, con el objetivo de ralentizar la velocidad de hibridación. Hemos estudiado la respuesta de palancas funcionalizadas con Oligo1 y Oligo2 tras su incubación de 24 h con las secuencias diana a 30nM.

La hibridación en superficie ha sido descrita basada en un mecanismo doble (Figura 3.6) por el que las sondas pueden hibridar con las secuencias diana directamente (t_s) y con las secuencias diana que se han adsorbido inespecíficamente a la superficie y difunden hasta la sonda (t_{ns}).¹⁵⁶

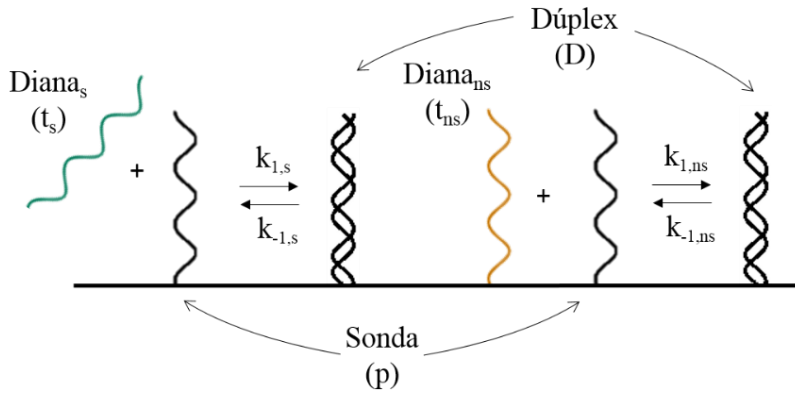


Figura 3.6 | Representación esquemática del modelo propuesto de hibridación en superficie.⁵³ $k_{1,s}$ y $k_{-1,s}$ son las constantes cinéticas de la reacción de hibridación en la que la sonda (p) y la secuencia diana (t_s) se encuentran directamente. $k_{1,ns}$ y $k_{-1,ns}$ son las constantes cinéticas de la reacción de hibridación en la que la secuencia diana (t_{ns}) se adsorbe primero sobre la superficie de forma inespecífica y después difunde y se encuentra con la sonda (p).

Por tanto, la formación del dúplex (D) puede describirse de la siguiente forma:

$$\frac{\partial [D]}{\partial t} = (k_{1,s}[p][t_s] - k_{-1,s}[D]) + (k_{1,ns}[p][t_{ns}] - k_{-1,ns}[D]) \quad (3.1)$$

Dado que a la temperatura que se lleva a cabo la hibridación (30° C) la formación del dúplex está favorecida, y teniendo en cuenta que en superficie aumenta la estabilidad de los dúplex,^{142,145} podemos asumir que las constantes de desnaturalización son muy inferiores a las de hibridación ($k_{-1,s} \ll k_{1,s}$ y $k_{-1,ns} \ll k_{1,ns}$) y despreciar las velocidades de desnaturalización. De esta forma, puesto que la concentración de sonda $[p]$ es fija, la velocidad depende de la concentración de secuencia diana total, $[t_T] = [t_s] + [t_{ns}]$.

Al disminuir la concentración de secuencia diana a 30 nM hemos encontrado el patrón B para ambas sondas (Figura 3.7), lo que apoya la asociación entre la observación de este patrón a tiempos de incubación largos (Figura 3.5 f)) y a una cinética de hibridación más lenta.

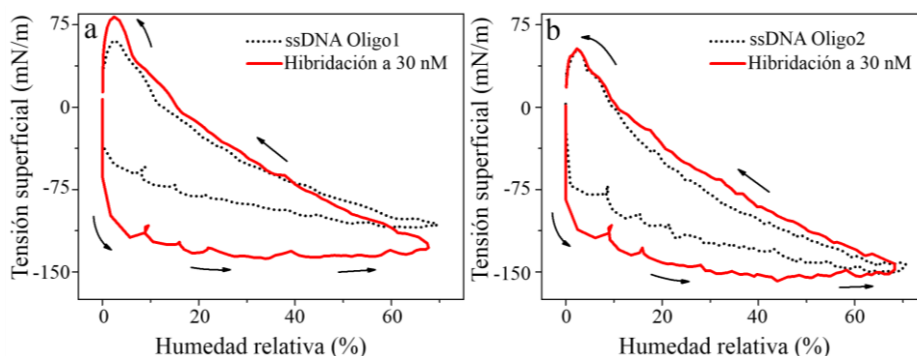


Figura 3.7 | Ralentización de las cinéticas de hibridación mediante la disminución de la concentración de las secuencias diana. Se muestra la tensión superficial inducida por un ciclo de hidratación/deshidratación de dos micropalanclas funcionalizadas con Oligo1 (a) y Oligo2 (b) antes (línea negra punteada) y después (línea roja sólida) de la hibridación durante 24 h con la secuencia diana a una concentración de 30 nM. Este tipo de respuesta ha sido clasificado como patrón B en la Figura 3.5.

3.2.2.2 Respuesta mecánica estática en función del tiempo de hibridación de Oligo1

Con el objetivo de conocer cómo se manifiesta la transición entre los patrones B y C, vistos en la Figura 3.5 para la secuencia Oligo1, se llevó a cabo también la hibridación de una matriz funcionalizada con Oligo1 a un tiempo de incubación intermedio entre 1 h (patrón B) y 24 h

(patrón C). La incubación con la sonda complementaria se llevó a cabo durante 6 h, a 30° C y una concentración de secuencia diana de 300 nM.

La Figura 3.8 a) muestra las curvas promedio de tensión superficial frente a la HR de tres matrices hibridadas durante 1 h (azul claro), 6 h (azul) y 24 h (azul oscuro). Cada curva representada es un promedio de las ocho palancas que contiene cada matriz. La zona sombreada representa la desviación estándar obtenida en cada caso. La curva obtenida a 6 h muestra una tensión superficial intermedia entre la de 1 h y la de 24 h. Por tanto, la transición es gradual. También se ha esquematizado el progreso de la tensión superficial con la HR a medida que aumenta el tiempo de hibridación (Figura 3.8 b)) y la variación de tensión superficial tomando como referencia la señal del ssDNA ($\sigma_{dsDNA} - \sigma_{ssDNA}$) (Figura 3.8 c)) frente al tiempo de hibridación. En las primeras etapas se da el aumento de tensión superficial con respecto del ssDNA debido a la presencia de los estados intermedios de hibridación. A medida que los dúplex se van cerrando completamente, el efecto de rigidez de las moléculas de dsDNA empieza a compensar el efecto anterior y la tensión se va haciendo cada vez más positiva, pasando por el patrón dado por el ssDNA y, finalmente, superándolo hacia los valores característicos de una capa formada por moléculas rígidas totalmente hibridada. Este comportamiento implica que a tiempos intermedios la detección de las secuencias complementarias no es posible y que debemos tener en cuenta la no linealidad de la respuesta estática a la hora de comparar señales obtenidas para secuencias con diferentes cinéticas de hibridación.

Estos resultados son coherentes con los del reciente trabajo de Tan *et al.*,¹⁵⁷ en el que también se demuestra la existencia de un punto ciego en la detección de DNA utilizando micropalancas en modo estático.

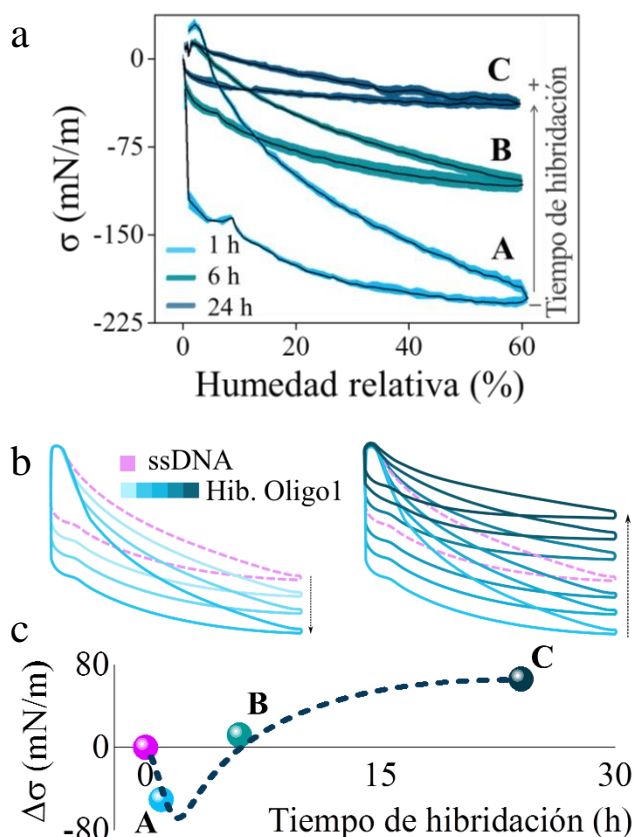


Figura 3.8 | Hibridación de Oligo1 en función del tiempo. a) Curvas promedio de tensión superficial frente a la HR de tres matrices hibridadas durante 1 h (A), 6 h (B) y 24 h (C). La zona sombreada representa la desviación estándar obtenida para las ocho palancas que contiene cada matriz. b) Representación del progreso de la tensión superficial con la HR a medida que aumenta el tiempo de hibridación. c) Variación de tensión superficial tomando como referencia la señal del ssDNA ($\sigma_{dsDNA} - \sigma_{ssDNA}$), frente al tiempo de hibridación.

Los autores justifican la presencia de un punto de detección inválida debido al balance entre las fuerzas electrostáticas, las fuerzas de hidratación y la entropía conformacional a una densidad específica de

DNA (5×10^{12} moléculas/cm²). Por encima de esta densidad prevalecen los efectos debidos a las fuerzas de hidratación, dando lugar a una tensión superficial negativa durante la media *in situ* de la hibridación; mientras que por debajo de dicha densidad prevalecen los efectos debidos al cambio de entropía conformacional, dando lugar a una tensión positiva durante la media *in situ* de la hibridación. Cuando la densidad es de 5×10^{12} moléculas/cm² los efectos mencionados se compensan y anulan la tensión superficial diferencial debida a la hibridación.

3.2.2.3 Estudio de la hibridación de secuencias distintas en una misma matriz

Con el objetivo de mostrar una prueba de concepto de un biosensor capaz de realizar detección múltiple simultánea, como se ha mencionado anteriormente, los mismos experimentos descritos hasta ahora fueron realizados con palancas funcionalizadas mediante un equipo piezo-dispensador, encontrando resultados consistentes entre las dos tecnologías.

En la Figura 3.9 se muestra la respuesta de tres palancas de una misma matriz, cada una funcionalizada con una secuencia distinta, antes y después de su incubación durante 1 h con la solución que contiene las hebras complementarias ComplOligo1 y ComplOligo2 y una competidora no relacionada, SecInterferente, a una concentración de 300 nM. En este caso, no se ha observado el patrón C descrito en la Figura 3.4 para ninguna de las sondas, ni siquiera tras la incubación durante 48 h a una concentración de 300 nM de secuencias diana. Es probable que esto sea debido a que las SAMs de DNA fabricadas por inyección sean

más desorganizadas y heterogéneas debido a la rápida evaporación de la gota, como se ha descrito en otros trabajos,¹²¹ lo que produciría cinéticas de hibridación más lentas.

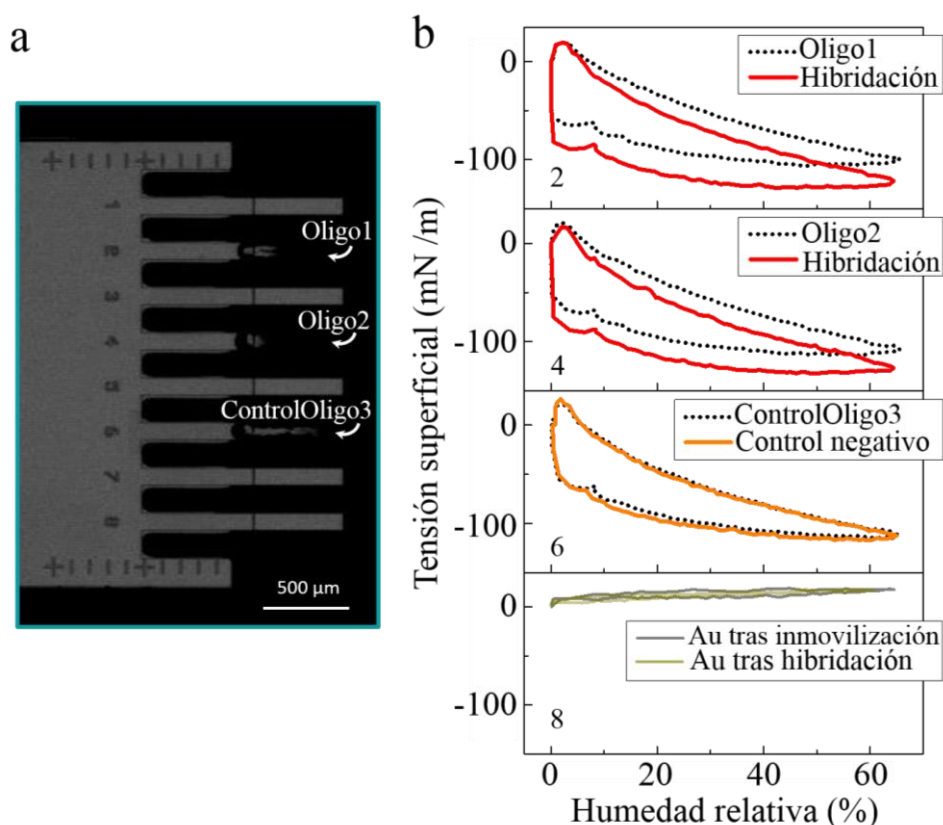


Figura 3.9 | Inmovilización e hibridación de secuencias distintas en una misma matriz. a) Imagen de una matriz de ocho palancas funcionalizada con tres secuencias diferentes (Oligo1, Oligo2 y ControlOligo3). Entre las palancas funcionalizadas se ha dejado una libre para evitar la contaminación cruzada. **b)** Tensión superficial en función de la hidratación/deshidratación de las tres palancas antes (línea negra punteada) y después (línea roja sólida) de la incubación de la matriz con las secuencias diana ComplOligo1 y ComplOligo2 (2,4 y 6) y respuesta de una palanca no funcionalizada (8) de la misma matriz.

3.2.2.4 Medidas complementarias por AFM

Las medidas de tensión superficial se han complementado con la caracterización por microscopía de fuerzas atómicas (AFM) de las monocapas de oligonucleótidos al 0% de HR, tras su hidratación al 37% y tras su deshidratación de nuevo al 0% (Figura 3.10). Estas SAMs fueron preparadas sobre superficies de silicio cubiertas con oro en paralelo a las micropalancas.

La caracterización por AFM revela que las capas de ssDNA se expanden con la hidratación desde 0 a 37%, dando lugar a un incremento del espesor medio para las secuencias utilizadas de 0.230 ± 0.035 nm. Después, las capas se encogen con la deshidratación y vuelven al espesor inicial.

Se ha estudiado el comportamiento de superficies funcionalizadas con las tres secuencias antes y después de ser incubadas con la muestra que contiene ComplOligo1, ComplOligo2 y SecInterferente a 300 nM durante 1h y 24 h.

En consistencia con las medidas de tensión superficial que muestran la respuesta tipo A, el espesor de las capas de ControlOligo3 (control negativo) no cambia tras la incubación en la solución que no contiene secuencias complementarias para esta sonda.

El comportamiento de las capas cambia cuando son incubadas con sus complementarias. Como se muestra en la gráfica de la Figura 3.10, volvemos a observar dos comportamientos distintos dependiendo del tiempo de incubación y de la secuencia inmovilizada.

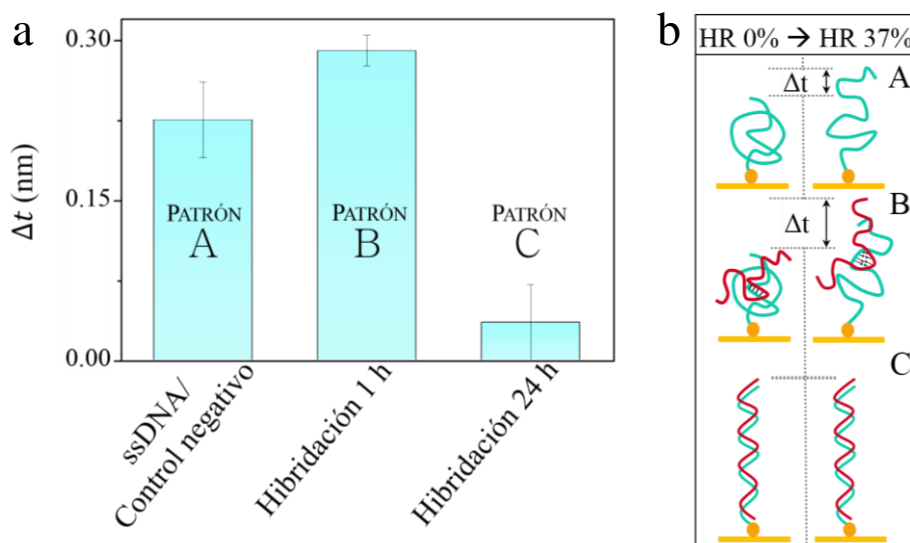


Figura 3.10 | Variación de los espesores de las monocapas de DNA medida por AFM cuando la humedad relativa aumenta desde 0% a 37%. a) Todas las capas de ssDNA y las de ControlOligo3 incubadas con la solución que contiene ComplOligo1 y ComplOligo2 muestran un incremento del espesor de 0.230 ± 0.035 nm. Estas SAMs son las que mostraban el patrón A de tensión superficial. La mayor variación de espesor, de 0.290 ± 0.014 nm, se genera en las capas de Oligo1 tras la incubación de 1 h y las de Oligo2 a ambos tiempos de incubación, coincidiendo con el patrón B. Las capas de Oligo1 incubadas 24 h con la solución que contiene su secuencia complementaria mostraron un incremento despreciable, dentro del error de medida, 0.035 ± 0.035 nm. Estas capas muestran el patrón C de tensión superficial. **b)** Representación de las variaciones de espesor de las distintas capas que dan lugar a los resultados mostrados en a).

El espesor medido por AFM aumenta con la hidratación para la mayoría de las muestras preparadas en paralelo a aquellas que mostraron el patrón B de tensión superficial. Las muestras funcionalizadas con

Oligo1 e hibridadas 1 h y las funcionalizadas con Oligo2 hibridadas a ambos tiempos de incubación mostraron una variación del espesor media de 0.290 ± 0.014 nm. Por otra parte, el espesor de las capas de Oligo1 tras la hibridación durante 24 h, que mostraban el patrón C de tensión superficial, permanece constante con la variación de HR, dando una variación media que está dentro del error de medida, 0.035 ± 0.035 nm. Como se ha explicado anteriormente, interpretamos que la mayoría de las cadenas implicadas en la hibridación han adoptado una configuración de doble hélice y los cambios de espesor esperados para cadenas no hibridadas o parcialmente hibridadas no ocurren en este caso. La mayor longitud de persistencia del dsDNA implica una mayor rigidez, y por tanto menor expansión de las moléculas de dsDNA con la hidratación, lo que se traduce en una variación del espesor de la capa despreciable (ver también que en el patrón C la curva de hidratación muestra una zona plana a partir de un 15% de HR aproximadamente).

3.3 Detección de oligonucleótidos sintéticos

Basándonos en el estudio de las respuestas de tensión superficial tras la hibridación, hemos definido arbitrariamente la señal de nuestro sensor, ΔS , como el valor absoluto de la diferencia de tensión superficial al 30% de HR entre las curvas de hidratación de antes y después de la incubación con la solución que contiene la secuencia diana, $\Delta S = |\sigma_{30\%,ssDNA} - \sigma_{30\%,dsDNA}|$ (ver ΔS en Figura 3.5). Hemos utilizado el valor absoluto de forma intencionada para tener en cuenta tanto las respuestas de tipo B, a tiempos cortos de incubación, como las de tipo C, características de capas totalmente hibridadas. La inclusión del patrón B como una señal positiva de detección es relevante, ya que un tiempo corto de detección

es clave para la aplicación de un sensor biológico al campo del diagnóstico molecular. Para investigar si ΔS podía ser utilizada como una señal fidedigna en la detección de secuencias específicas, hemos estudiado la hibridación de 24 matrices (192 micropalancas) en diversas condiciones.

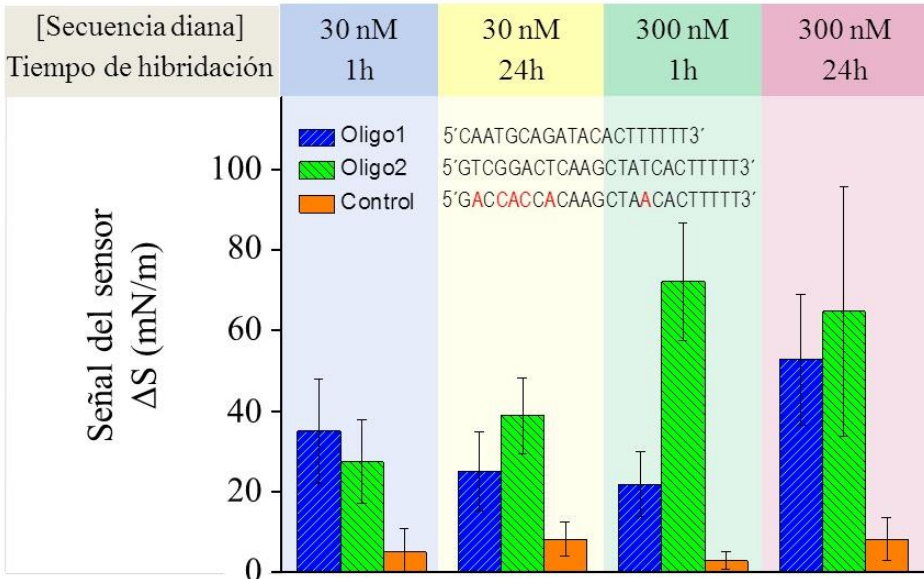


Figura 3.11 | Detección de oligonucleótidos sintéticos. Se muestran los valores medios y desviación estándar de la señal del sensor, ΔS , definida como el valor absoluto de la diferencia de tensión superficial al 30 % de HR antes y después de la hibridación, $\Delta S = |\sigma_{30\%,ssDNA} - \sigma_{30\%,dsDNA}|$, medida en 177 micropalancas funcionalizadas con las secuencias Oligo1 (columnas azules), Oligo2 (columnas verdes) y ControlOligo3 (columnas naranjas). La hibridación se llevó a cabo durante dos tiempos de incubación (1 h y 24 h) y a dos concentraciones de secuencia diana (30 y 300 nM). Oligo2 y ControlOligo3 difieren en 6 bases (resaltadas en rojo en la sonda control).

En la Figura 3.11 Se presentan los resultados de 177 micropalancas medidas, ya que 15 se rompieron durante los experimentos. Cada experimento comprende tres matrices funcionalizadas con las tres secuencias utilizadas en el presente capítulo, incubadas en la solución que contiene ComplOligo1, ComplOligo2 y SecInterferente a 30 nM o 300 nM; durante 1 h o 24 h. Oligo2 y la secuencia que actúa como control negativo (ControlOligo3) difieren en 6 bases. Se representan el valor medio y la desviación estándar de la respuesta del sensor ΔS para las condiciones estudiadas. También se muestran el valor medio y la desviación estándar de la señal ΔS para las 64 palancas control medidas.

Definiendo un valor umbral de discriminación como la media del valor de los controles negativos más dos veces la desviación estándar en estos controles, obtenemos una sensibilidad de 0.95 y una especificidad de 0.98, definidas como la tasa de verdaderos positivos en el ensayo y verdaderos negativos en los controles, respectivamente. Se demuestra, por tanto, la idoneidad de esta metodología para la identificación de oligonucleótidos.

Sin embargo, estos resultados también ponen de manifiesto que la señal ΔS es muy sensible a las condiciones experimentales discutidas anteriormente, como puede deducirse de las desviaciones estándar de los experimentos realizados (ver barra de error en las columnas de Oligo2 (verdes) a 300 nM y 24 h de incubación en la Figura 3.11). Trabajos teóricos previos han revelado que pequeñas cantidades de desorden en las monocapas de DNA pueden afectar a la deflexión de las palancas.^{55,158-160} Kosaka *et al.*¹⁰⁵ demostraron la heterogeneidad de capas de DNA autoensambladas altamente empaquetadas en oro. Es muy probable que las variaciones observadas del valor ΔS de muestra a

muestra, para la misma secuencia y condiciones de incubación, se deban a diferencias en la densidad de inmovilización y a la presencia de regiones heterogéneas. Estas diferencias no impiden la detección de las secuencias complementarias, incluso a bajas concentraciones, pero dan lugar a la gran dispersión de valores que vemos en la Figura 3.11.

Se ha observado que cuando el lavado previo a la funcionalización de las superficies con DNA incluye un paso final de aclarado con agua la reproducibilidad de la respuesta dinámica con la hidratación es muy baja, lo que ha sido asociado a una gran variabilidad en la densidad superficial de DNA (Capítulo 5). Por este motivo, para los experimentos de los Capítulos 5 y 6 se siguió un protocolo de lavado basado en alcohol isopropílico y acetona (ver Capítulo 2).

Además, no podemos ignorar pequeñas variaciones incontroladas debidas a la cantidad de grupos disulfuro formados en las alícuotas de DNA por la oxidación de los grupos tiol. Se ha demostrado previamente el efecto de la unión de los tioles o grupos disulfuro sobre la densidad de inmovilización y la tensión superficial en micropalancas, y se ha observado que el anclaje de cadenas tioladas produce tensiones mayores, relacionadas con densidades más altas, mientras que el anclaje de las cadenas unidas por puentes disulfuro produce monocapas menos densas que generan menor tensión superficial durante la inmovilización.¹⁶¹

Por otra parte, la señal ΔS también muestra una gran desviación no solo entre experimentos realizados con la misma secuencia y en idénticas condiciones de incubación, sino entre las diferentes secuencias. Esta variabilidad puede ser consecuencia de la diferencia en las cinéticas de hibridación y a la existencia del punto ciego (ver Figura 3.8 b)). Tomando como ejemplo la condición 300 nM – 1 h: las capas formadas

por Oligo1, cuya cinética es más rápida, ya se encontrarían acercándose al punto ciego (B en la Figura 3.8), mientras que aquellas formadas por Oligo2 estarían todavía en el valor más negativo de tensión superficial (A en Figura 3.8), por lo que la magnitud de la señal ΔS de Oligo2 resulta finalmente mucho mayor que la de Oligo1. Evidentemente, no podemos obviar las variaciones en la densidad superficial mencionadas como posibles corresponsables de esta variabilidad.

Dadas las condiciones actuales la cuantificación de la concentración de las secuencias complementarias no es posible con la metodología presentada. Por una parte, debido a las fuentes de variabilidad mencionadas. La cuantificación requiere todavía un mayor control de la inmovilización y las condiciones de hibridación, incluso cuando se utilice una matriz como control negativo o referencia. Este es un problema compartido con otras metodologías basadas en la hibridación de DNA anclado a superficies, como los *microarrays* de DNA basados en fluorescencia, que han llegado a mostrar variaciones de hasta el 20 % en las medidas de niveles de expresión, incluso cuando son medidas por el mismo usuario, con el mismo equipo y en las mismas condiciones.^{17,162} Por otra parte, dadas las condiciones de estudio, existe un punto ciego que no permite la detección de las secuencias complementarias en la transición del patrón B al C, y la intensidad medida no presenta un comportamiento lineal, por lo que además, se deberán ajustar las condiciones de tal forma que la respuesta se comporte de forma lineal y se evite el punto ciego.

3.4 Conclusiones

Esta es la primera vez que se demuestra la detección nanomecánica *ex situ* de oligonucleótidos con SAMs de DNA que no presentan una configuración considerada ideal para detección nanomecánica, es decir, no se encuentran extendidas desde el punto de anclaje a la palanca. Además, a diferencia de cómo se ha realizado hasta ahora en el campo, la funcionalización para la detección se ha realizado sobre una capa de oro depositada por el proveedor comercial, prescindiendo de la deposición en un entorno de sala blanca inmediatamente antes del anclaje de las moléculas biológicas.

A pesar de presentar la conformación mencionada, la respuesta nanomecánica estática de las SAMs de ssDNA es altamente reproducible.

Se ha demostrado que las cinéticas de hibridación y su dependencia de múltiples variables, como la longitud y composición de las hebras, o la densidad de inmovilización; juegan un papel relevante en la identificación de oligonucleótidos sintéticos mediante detección *ex situ* nanomecánica.

Por primera vez se han observado diferentes patrones de respuesta para las capas hibridadas, que han sido asociadas a las diferencias en los tiempos de hibridación en superficies, y se ha demostrado experimentalmente por detección nanomecánica *ex situ* la existencia de un punto ciego que no permite la correcta discriminación de las secuencias.

A pesar de todas las fuentes de variabilidad, no controladas por el momento, implicadas en las respuestas medidas, el conocimiento adquirido sobre las monocapas ha permitido la detección de secuencias cortas de DNA con elevada sensibilidad (0.95) y especificidad (0.98). Demostramos la identificación de oligonucleótidos a tiempos cortos de incubación (1 h) y bajas concentraciones (30 nM). Estos resultados abren la puerta al desarrollo de un sensor nanomecánico para la detección de secuencias de relevancia clínica microbiológica a través del estudio de la respuesta estática de las palancas.

Sin embargo, la cuantificación de la concentración de la secuencia diana sigue siendo un desafío para esta metodología de detección *ex situ* y que prescinde de marcaje. La variabilidad observada en los valores de la señal del sensor debe ser controlada mediante un mayor control de la superficie de oro, la oxidación de los tioles o el desarrollo de etapas de bloqueo alternativas que permitan definir mejor la conformación de las SAMs. El conocimiento preciso de las cinéticas de hibridación de las diferentes sondas también favorecería poder realizar la cuantificación llevando a cabo correcciones similares a las que se realizan en el análisis de los *microarrays* basados en fluorescencia.¹⁶³

Capítulo 4

Detección de *Mycobacterium tuberculosis* y su resistencia a rifampicina a través de la medida de la tensión superficial

4.1 Introducción

La tuberculosis (TB) es una de las principales causas de muerte en el mundo debidas a un agente infeccioso.¹⁶⁴ Está causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), 9.6 millones de personas desarrollaron TB y 1.5 millones murieron debido a esta enfermedad en 2014.¹⁶⁴ Aunque los portadores sanos de MTB no suelen desarrollar síntomas, ya que el sistema inmune mantiene a la bacteria en un estado latente, pueden actuar como vectores del patógeno. Se estima que existen de 2 a 3 billones de personas portadoras en el mundo, de las cuales en torno a un 5 – 15% desarrollarán síntomas a lo largo de su vida debido a una depresión del sistema inmune.

La propagación de cepas multirresistentes (MDR, resistentes a antibióticos de primera elección) y extensamente resistentes (XDR, resistentes a antibióticos de primera y segunda elección) es un problema cada vez mayor, habiéndose reconocido como una amenaza global desde 2006.¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ Aunque el diagnóstico de estas formas de la enfermedad está aumentando progresivamente, la detección total de los casos resistentes está lejos de ser alcanzada. En 2014 se detectó solo un 26% de los casos MDR estimados.¹⁶⁴ Estas variantes de la enfermedad son tratables si son diagnosticadas a tiempo correctamente. Pero si no son detectadas rápidamente, la mortalidad, el riesgo de desarrollar nuevas resistencias a otras drogas y el riesgo de generar brotes aumenta estrepitosamente.¹⁶⁷

El desarrollo de sistemas de diagnóstico inmediato (POC, por sus siglas en inglés de *point-of-care*) asequibles y sencillos es clave para abordar la erradicación de la epidemia de TB. En este capítulo se demuestra la capacidad de los sensores nanomecánicos basados en micropalancas de afrontar este desafío.

El test de referencia para el diagnóstico de la TB ha sido durante décadas, y continúa siendo, el cultivo de la micobacteria. La principal desventaja que presenta es que los resultados se obtienen al cabo de semanas, debido a la baja tasa de crecimiento de este patógeno. El análisis de frotis de esputos por microscopía también se ha empleado ampliamente a pesar de su baja sensibilidad.¹⁶⁸ Los ensayos basados en inmunodetección, aunque se utilizan frecuentemente, pueden llegar a dar un 35% de falsos positivos.¹⁶⁹

Por otra parte, la resistencia a antibióticos se ha detectado, tradicionalmente, mediante pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por difusión de antibióticos sobre especímenes cultivados en agar.^{164,170}

Los ensayos de biología molecular son los que han demostrado mayor rapidez y eficiencia en la identificación de MTB y la resistencia a antibióticos, siendo la PCR en tiempo real (RT-PCR) la tecnología de referencia,^{164,167} con sensibilidades comparables a los métodos basados en el cultivo.¹⁶⁷ Sin embargo, la RT-PCR todavía requiere un equipamiento costoso y complejo, personal cualificado y una rutina de mantenimiento,¹⁶⁸ lo que compromete su implementación en países en desarrollo.¹⁷¹

Actualmente se están desarrollando nuevas tecnologías que permitan reducir los costes y tiempos de análisis, al tiempo que se aumenta la sensibilidad, portabilidad y la capacidad del sensor de ser utilizado y desechado.¹⁷¹⁻¹⁷⁹ No obstante, son escasos los ensayos capaces de detectar concentraciones bajas del patógeno que prescindan de amplificación por PCR y marcaje (ver Tabla 4.2). Por el momento, la aplicación de las micropalancas a la detección bacteriana es limitada,^{98,99} a pesar de haber sido utilizadas con éxito a la detección de DNA.⁸⁻¹¹

En este capítulo se demuestra la detección de *M. tuberculosis* y la identificación de la resistencia a rifampicina utilizando DNA genómico (gDNA) extraído de cultivos bacterianos sin necesidad de amplificación por PCR. Para ello se aplica la metodología desarrollada en el Capítulo 1, basada en la cuantificación de la tensión inducida por la hidratación de monocapas de DNA ancladas a micropalancas antes y después de la hibridación con las secuencias diana escogidas. Por otra parte, una de las limitaciones importantes que presentan los sensores nanomecánicos es el desarrollo de sistemas de alto rendimiento.²⁷ En este capítulo, se muestra también una plataforma de incubación y medida de las matrices que

demuestra la capacidad de implementación futura en equipos de detección múltiple de alto rendimiento.

4.2 Sondas y técnica de detección

Para identificar al patógeno hemos diseñado una sonda, a la que hemos llamado ISsec, que hibrida con una región de 20 bases presente en el elemento IS6110, una secuencia de inserción* característica de las especies del complejo MTB.¹⁸⁰ Esta secuencia permite discriminar con precisión aislados de MTB, habiendo sido propuesta como una referencia para el diagnóstico de la TB.¹⁸¹ También hemos diseñado una sonda, llamada aquí *rpoB_mut531*, para detectar la resistencia a rifampicina. La rifampicina inhibe el crecimiento de MTB mediante su unión al sitio activo de la polimerasa de RNA bacteriana, bloqueando la transcripción del DNA. Esta resistencia aparece como resultado de una mutación única en el gen que codifica la subunidad β de dicha polimerasa, *rpoB*. El valor de la detección de la resistencia a rifampicina radica en que ha sido descrita en más del 90% de los aislados multirresistentes, por lo que se utiliza como un marcador de tuberculosis MDR.¹⁸² La sonda *rpoB_mut531* detecta, específicamente, la mutación 531 del gen *rpoB*. Debido a que la diferenciación entre una MTB resistente de una sensible requiere la discriminación de un desapareamiento debido a una única base en este gen, se ha analizado

Una **secuencia de inserción (IS)* es un segmento de DNA móvil de menos de 2.500 pb. En determinados casos, la localización de las IS en el cromosoma es lo suficientemente estable para permitir su utilización como marcadores en estudios de genotipado o epidemiológicos.²²

la respuesta del sensor frente a muestras de MTB resistentes utilizando como sonda control la secuencia correspondiente de la bacteria sensible al antibiótico, cuyo genoma carece de la mutación mencionada en *rpoB* (sonda control *rpoB_wt*). Las sondas y secuencias utilizadas como controles negativos empleadas en este estudio se muestran en la tabla 1. En la sonda *rpo_mut531*, utilizada para detectar la resistencia a rifampicina, se ha marcado en rojo la base mutada (responsable de la resistencia) respecto de la secuencia perteneciente a la cepa silvestre, llamada *rpoB_wt* y utilizada como control negativo.

Nombre	Tipo	Secuencia de DNA
<i>ISsec</i>	Sonda	5'- GGTCTGCTACCCACAGCCGG TTTTT -C ₃ H ₆ -SH-3'
<i>ControlOligo</i>	Sonda control (control negativo)	5'- GTCGGACTCAAGCTATCAC TTTTT -C ₃ H ₆ -SH-3'
<i>rpoB_mut531</i>	Sonda	5'- GCCGACTGTGGCGCTGGG TTTTT -C ₃ H ₆ -SH-3'
<i>rpoB_wt</i>	Sonda control (control negativo)	5'- GCCGACTGTGGCGCTGGG TTTTT -C ₃ H ₆ -SH-3'

Tabla 4.1 | Secuencias de DNA empleadas en el presente estudio.

La identificación de secuencias se lleva a cabo mediante la cuantificación de la señal ΔS definida arbitrariamente para el sensor desarrollado en el Capítulo 3 (ver ΔS en la Figura 4.1 d)). Recordemos que esta señal se obtiene a partir del valor absoluto de la diferencia de tensión superficial al 30% de HR entre las curvas de hidratación previa y posterior a la incubación con la solución que contiene la secuencia diana, $\Delta S = |\sigma_{30\%,ssDNA} - \sigma_{30\%,dsDNA}|$. De esta forma, cada palanca está auto-referenciada, es decir, la respuesta de la hibridación es relativa a la de la sonda antes de la hibridación, lo que elimina señales espurias que surgen debido a pequeñas diferencias en las propiedades mecánicas entre palancas.

4.3 Detección de un amplicón obtenido a partir de la IS6110

En este trabajo se utiliza por primera vez la tensión superficial inducida por la hidratación de las capas de DNA en micropalancas para detectar DNA de origen celular. La primera prueba de concepto y optimización se ha realizado abordando la detección de un amplicón de IS6110 de 122 pb. El amplicón se amplificó y purificó por el grupo del Dr. Jesús Mingorance, del departamento de Microbiología del Hospital La Paz, Madrid. Los oligonucleótidos empleados en la PCR se han obtenido de la bibliografía.¹⁰⁹ Para detectar el amplicón procedente de MTB, las palancas se funcionalizaron con la sonda ISsec. Las palancas utilizadas como control negativo se funcionalizaron con la sonda control, no relacionada, llamada aquí ControlOligo (ver Tabla 4.1). El amplicón recibido se utilizó como secuencia diana a concentraciones comprendidas entre 10 ng/mL y 1 fg/mL. La hibridación se llevó a cabo durante 1 h. Hemos evitado utilizar tiempos de hibridación más largos dada la necesidad de un análisis rápido para detectar al patógeno.

Una de las peculiaridades de este estudio, aparte de la utilización de amplicones y DNA genómico, consiste en la incubación y lectura simultánea de varias matrices. Dada la importancia del multiplexado para una futura aplicación en el campo del diagnóstico clínico, se ha desarrollado una plataforma a partir de una placa comercial de 96 pocillos en la que se puede llevar a cabo la incubación de todos los pasos necesarios (funcionalización, hibridación y lavados) y la medida de la tensión superficial de las palancas en el equipo comercial *SCALA-Bio* (MecWins, España). Los detalles de la modificación y adecuación de esta placa para nuestros objetivos se encuentran en el Capítulo 2.

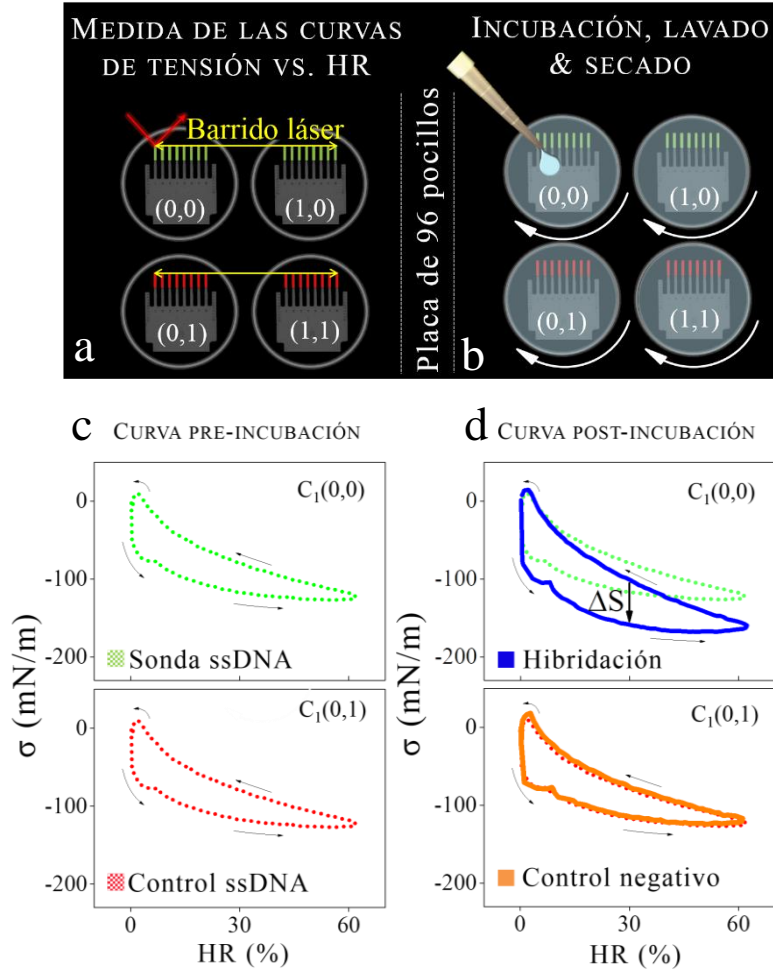


Figura 4.1 | Representación de los pasos seguidos para completar un experimento múltiple simultáneo. a) Medida de la tensión superficial en función de la HR. b) Incubaciones, lavados y secado en la placa de 96 pocillos modificada. c) Ejemplo de una curva medida en las palancas etiquetadas como $C_1(0,0)$ Y $C_1(0,1)$, según su posición en la matriz y en la placa, antes de la incubación con el DNA diana. d) Curvas medidas en las mismas palancas de c) tras la exposición al DNA diana de MTB. El valor absoluto de la diferencia de tensión superficial al 30% de HR entre las curva de hidratación pre y post-incubación define la señal del sensor ΔS , $\Delta S = |\sigma_{30\%,ssDNA} - \sigma_{30\%,dsDNA}|$.

En la Figura 4.1 recordamos los pasos básicos para completar un experimento de detección. En primer lugar, las matrices de micropalanca se adhieren a la superficie de PDMS de la placa. Se funcionalizan y se lavan (Figura 4.1 b)), bajo agitación y temperatura controladas, y se secan con N₂ seco en la misma placa. La placa se coloca en el equipo *SCALA-Bio* y el láser realiza un primer barrido para medir la tensión superficial de cada palanca funcionalizada con ssDNA (Figura 4.1 a)) y que sirve de referencia. Se muestra una curva representativa de este paso en la Figura 4.1 c)), habiéndola llamado “curva de pre-incubación”. Cada curva queda registrada, junto con la posición de la palanca en la matriz y en la placa. Después, las matrices se incuban en la placa durante 1 h con la solución de hibridación (Figura 4.1 b)), se lavan, se secan y la tensión superficial se vuelve a medir (Figura 4.1 a)), obteniendo las curvas “post-incubación”. En la Figura 4.1 d) se muestran curvas representativas tras la hibridación con la secuencia diana de MTB (Figura 4.1 d) arriba) y del control negativo (Figura 4.1 d) abajo). En este caso las curvas post-hibridación obtenidas siempre presentan mayor tensión superficial con la hidratación que las de pre-incubación, ya que la hibridación se lleva a cabo durante 1 h y a concentraciones bajas (1 fg/mL-10 ng/mL) de secuencia diana (patrón etiquetado como B en el Capítulo 3, ver Figura 3.5).

En la Figura 4.2 se muestran las señales medidas, los valores medios y la desviación estándar de la señal del sensor, ΔS , obtenida de las 96 micropalanca incubadas con el amplicón. Definiendo, como se ha descrito anteriormente, un valor umbral de detección como el valor medio de los controles más dos veces la desviación estándar, la tasa de verdaderos positivos (VP) obtenida es de 0.93, mientras que la tasa de verdaderos negativos (VN) es de 0.93. Como podemos ver en la Figura

4.2, la señal nanomecánica evidencia la detección y discriminación del amplicón a concentraciones iguales o mayores a 10 fg/mL. Para el cálculo de las tasas de VP y VN hemos incluido todos los controles para el rango de concentraciones estudiado y las señales positivas obtenidas a partir del límite de detección. Volvemos a observar una gran variabilidad en la señal del sensor medida tras la hibridación con el amplicón, como se aprecia en las barras de error correspondientes a ISsec en la Figura 4.2, probablemente debidas a pequeñas diferencias en la densidad de empaquetamiento de las capas de ssDNA, no controladas en este estudio. Este efecto ya ha sido previamente discutido en el Capítulo 3 para oligonucleótidos sintéticos.

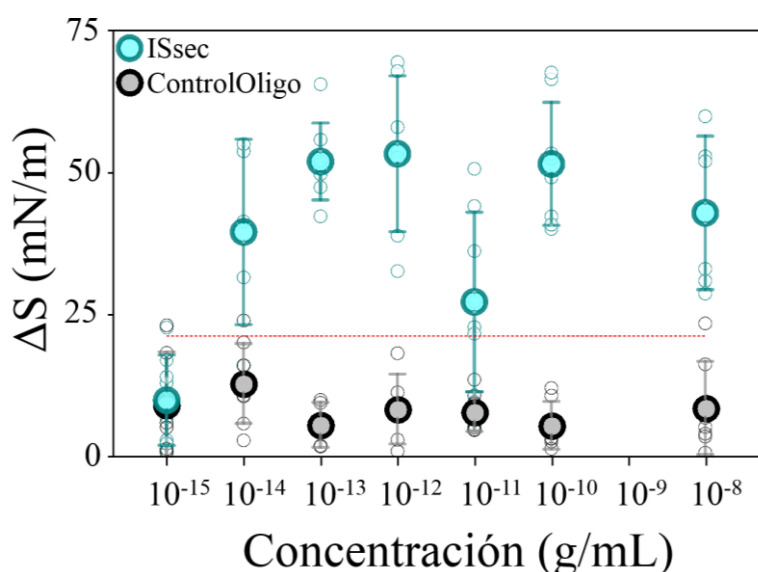


Figura 4.2 | Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la identificación de amplicones de IS6110. Se muestran los valores, la media y la desviación estándar de las señales ΔS obtenidas de 96 micropalancas, funcionalizadas con ISsec (complementaria a una región de IS6110, círculos azules) y ControlOligo (sonda control, círculos negros) e incubadas con el amplicón de IS6110. El límite de detección alcanzado es 10 fg/mL.

4.4 Detección de *Mycobacterium tuberculosis* y su resistencia a rifampicina a partir de muestras de DNA genómico

Una vez lograda la detección de la bacteria mediante la hibridación de un amplicón de 122 pb, el siguiente reto era la detección de DNA genómico. Este es el primer trabajo en el que se aborda la detección de DNA genómico, sin amplificación previa, con una técnica de detección nanomecánica *ex situ*. El gDNA fue extraído y purificado de dos aislados clínicos mediante la utilización del kit de extracción de DNA microbiano *UltraClean*® de MoBio (EEUU) por Alma Sotillo, del departamento de Microbiología del Hospital La Paz (Madrid), de dos tubos indicadores de crecimiento de micobacterias (MGIT). Uno de ellos (wt) era susceptible a todos los antibióticos, y el otro (mut531) presentaba la mutación S531L (TCG→TTG) en el gen *rpoB*, lo que le confería resistencia a rifampicina. Con el objetivo de favorecer la accesibilidad de las secuencias diana a las sondas ancladas, el gDNA se digirió parcialmente con la enzima de restricción *AluI* (Thermo Scientific), que en IS6110 deja libre un fragmento de 554 pb que contiene la región llamada aquí ISsec para la identificación de la bacteria y en *rpoB* un fragmento de 586 pb que contiene la secuencia llamada *rpoB_mut531*, indicativa de la resistencia a rifampicina. Aparte del DNA diana, la solución de hibridación también contenía proteínas procedentes de la digestión y el tampón de hibridación y fragmentos de gDNA no relacionados con las sondas.

En la Figura 4.3, se muestran todos los valores, los valores medios y la desviación estándar de la señal ΔS obtenida de 66 micropalancas funcionalizadas con ISsec y ControlOligo e incubadas con el gDNA digerido del aislado sensible (wt) a concentraciones comprendidas entre

20 ng/mL y 200 fg/mL. Se ha definido, como en el caso anterior, el umbral de detección como la media de los controles negativos más dos veces su desviación estándar. El límite de detección observado para la detección de IS6110 con muestras de DNA genómico es 20 pg/mL, con una tasa de VP de 1 y de VN de 0.97.

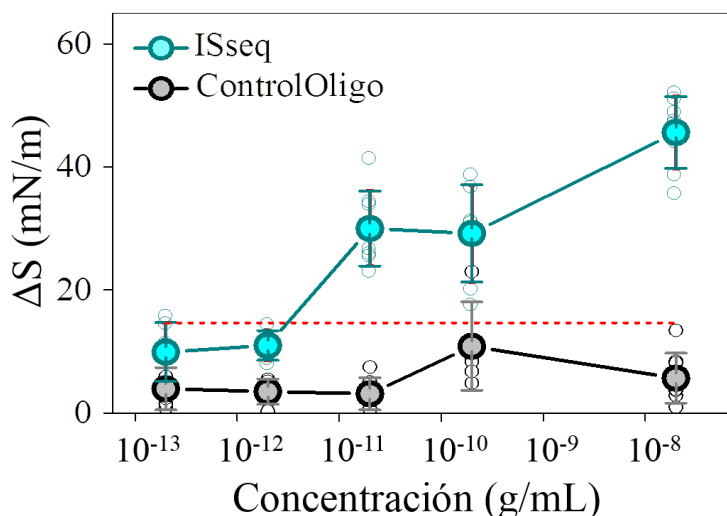


Figura 4.3 | Identificación de *Mycobacterium tuberculosis* a partir de DNA genómico extraído, purificado y digerido parcialmente con una enzima de restricción. Se muestran las señales medidas, los valores medios y la desviación estándar de la señal del sensor ΔS obtenida de 66 micropalancas funcionalizadas con ISsec (círculos azules) y ControlOligo (círculos negros) e incubadas con el gDNA digerido del aislado sensible (wt) a concentraciones comprendidas entre 20 ng/mL y 200 fg/mL. El límite de detección es de 20 pg/mL La tasa de VP es de 1 y de VN de 0.97.

La detección de la resistencia a rifampicina representa un reto, dado que la sonda que detecta al DNA diana y la sonda control difieren en una única base. La Figura 4.4 muestra los valores, la media y desviación

estándar de las señales ΔS medidas en las 56 micropalancas funcionalizadas con rpo_mut531 (secuencia de detección de resistencia a rifampicina debida a la mutación 531) y rpo_wt (control negativo, obtenido del genoma de la cepa silvestre) e incubadas con el gDNA digerido del aislado resistente (mut531). Las concentraciones ensayadas están comprendidas, como en el caso anterior, entre 20 ng/mL y 200 fg/mL. El límite de detección observado para la detección de la secuencia rpoB_mut531 es también de 20 pg/ mL. La tasa de VP es de 0.84 y la de VN de 1.

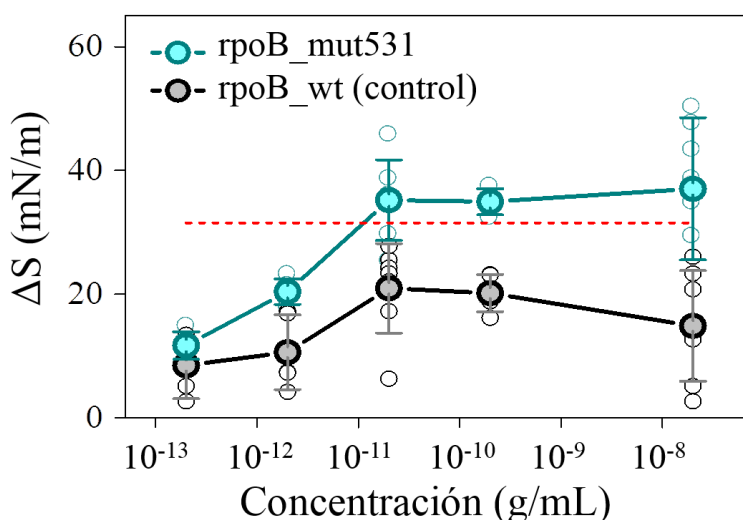


Figura 4.4 | Identificación de la resistencia a rifampicina de MTB a partir de DNA genómico extraído, purificado y digerido parcialmente con una enzima de restricción. Se muestran las señales medidas, los valores medios y la desviación estándar de la señal del sensor ΔS obtenida de 56 palancas funcionalizadas con rpoB_mut531 (círculos azules) y rpoB_wt (círculos negros). El límite de detección es de 20 pg/mL. La resistencia a rifampicina requiere la discriminación del desapareamiento debido a una única base. La tasa de VP es de 0.84 y de VN de 1.

Se demuestra así que la técnica desarrollada presenta el límite de detección suficiente como para detectar la presencia de gDNA de *M. tuberculosis* en una muestra proteínica con DNA interferente (no relacionado) a concentraciones de gDNA tan solo de 20 pg/mL. Esta concentración de gDNA es equivalente a una concentración bacteriana estimada de 5000 células/mL.

Hay que tener en cuenta que, dado que las concentraciones ensayadas corresponden al gDNA, la concentración de secuencias diana es menor. Teniendo en cuenta el tamaño del genoma de MTB, 4.5×10^6 pb, y los tamaños de los fragmentos ensayados, 554 y 586 pb, las concentraciones de DNA diana detectadas se encuentran en el rango de los fg/mL.

El método también es capaz de discriminar un desapareamiento debido a una única mutación, implicado en la resistencia al antibiótico rifampicina. En la Figura 4.3 podemos ver las diferentes tendencias de la señal del sensor con la concentración mostradas por un apareamiento perfecto (ISsec) y la interacción entre dos secuencias no complementarias (ControlOligo). Sin embargo, en la Figura 4.4 vemos tendencias similares con el aumento de concentración para las dos sondas rpoB_mut531 y rpoB_wt. En este caso, el apareamiento es específico al 100% para rpoB_mut531 y al 95% para rpoB_wt, ya que rpoB_wt solo presenta una base no complementaria de 19, por lo que solo podemos esperar una diferencia en la afinidad de apareamiento, como en efecto es visible en la Figura 4.4. Aun así, esta diferencia es suficiente para permitir la discriminación de una única mutación. Si se requiriese aumentar la capacidad de diferenciación, se debería aumentar la astringencia durante la hibridación. Dado que un aumento de la temperatura compromete el enlace S-Au, la mejor opción sería utilizar

un tampón de hibridación que desestabilizase en mayor medida los dúplex de DNA que presenten desapareamientos.

Tecnología	Límite de detección (CFU/mL)	Tiempo de análisis	Vol. de muestra	Testado con MTB	Resistencia a antibióticos
Biosensor de cuarzo piezoeléctrico multicanal ¹⁷⁷	10	> 1 día	500 µL	Sí	No
Ensayo de flujo inmunomagnético 3D ¹⁷²	10	3 min	10 mL	No	No
Cepheid Gene XPERT ¹⁶⁷	131	2 h	2-3 mL	Sí	Sí
Microbalanza de cuarzo ¹⁷⁸	10 ⁵	20 min	160 µL	Sí	No
Biosensor de resonancia magnética ¹⁷⁹	10 ³	30 min	5 – 10 µL	No	No
Biosensor de resonancia de plasmón superficial ¹⁷⁶	2x10 ⁶	< 1 h	—	Sí	No
Biosensor electroquímico basado en nanopartículas de oro ¹⁷⁵	3x10 ⁵	> 3 h	—	Sí	No
Biosensor de palancas (modo dinámico) ^{98,99}	700	1 – 2 h	2 mL	No	No
Biosensor de micropalancas (tensión inducida por hidratación) ^{este trabajo}	5000	1 h 30 min	50 µL	Sí	Sí

Tabla 4.2 | Comparativa entre tecnologías aplicadas a la detección bacteriana y la identificación de resistencias a antibióticos.

En la Tabla 4.2 comparamos la metodología aquí presentada con otras tecnologías existentes, tanto maduras y establecidas como emergentes, aplicadas a la detección bacteriana. Se comparan los tiempos de análisis, límites de detección y volumen de muestra necesario. También se identifican las metodologías ya testadas con el patógeno *M. tuberculosis* y su resistencia a antibióticos.

Los sensores basados en micropalancas presentan la ventaja de requerir volúmenes de muestra muy pequeños. Además, el sistema de detección presentado permite mantener un diseño muy sencillo de las mismas. Los pasos de incubación se pueden llevar a cabo de forma similar a los protocolos estandarizados con placas de pocillos, como en el caso de los ensayos ELISA. Todos los pasos que en este momento requieren un manejo manual pueden ser automatizados.^{36,94,183} El sistema de lectura y de alineamiento óptico es accesible y ha sido ya automatizado por la técnica de barrido láser.^{85,88} Además, las palancas de silicio empleadas en esta tesis (sin sistema de lectura integrado) también pueden ser producidas a escala industrial a precios muy bajos. Así, todos los elementos básicos de esta tecnología son compatibles con una automatización futura total y una lectura de alto rendimiento a bajo coste en una plataforma de diagnóstico inmediato (POC).

4.5 Conclusiones

En este capítulo se demuestra por primera vez la detección de DNA genómico, sin previa amplificación por PCR, con una técnica de detección nanomecánica *ex situ*.

En trabajos previos se ha detectado RNA celular, directamente extraído o amplificado utilizando una RNA polimerasa, mediante detección nanomecánica *in situ* con límites de detección de entre 10 – 20 $\mu\text{g/mL}$, relaciones señal-ruido en torno a 10 y como pruebas de concepto.^{9,10} En este trabajo se han alcanzado límites de detección en el rango de los fg – pg/mL, con una relación señal-ruido en torno a 20 y se han medido un total de 218 palancas.

La cuantificación de la tensión inducida por la hidratación en micropalancas proporciona una nueva vía de identificación de patógenos a través de genes conservados, así como de identificación de resistencias a antibióticos, como la resistencia a rifampicina. Se ha demostrado que la técnica tiene capacidad para detectar una única mutación en una muestra con una concentración de 20 pg/mL de gDNA, en la que la secuencia diana se encuentra entre gDNA interferente en exceso. Aunque en este trabajo el DNA genómico sí procede de cultivos bacterianos, la concentración de DNA detectada es equivalente a una concentración bacteriana estimada de 5000 células/mL, por lo que se demuestra la aplicabilidad al diagnóstico de TB a partir de muestras de pacientes prescindiendo de pasos previos de cultivo bacteriano o amplificación por PCR.

La detección del patógeno se lleva a cabo en un tiempo de análisis total de 1 h y 30 minutos. La metodología puede ser aplicada fácilmente

a la detección de diferentes microorganismos, y está lista para un futuro desarrollo de dispositivos miniaturizados de detección múltiple. Estos resultados invitan al desarrollo de una plataforma de diagnóstico inmediato totalmente automatizada. Todos estos avances ayudarán al diagnóstico ultra rápido de las infecciones y a su correcto tratamiento antibiótico.

Capítulo 5

Estudio de la respuesta dinámica de micropalancas con monocapas de DNA

5.1 Introducción

Como ya hemos visto en capítulos anteriores, la inmovilización de monocapas auto-ensambladas (SAMs) sobre superficies y estructuras nanomecánicas constituye la base sobre la que se asienta el desarrollo de sensores ultrasensibles de nueva generación.^{11,50,68,184-186} Sin embargo, la formación de capas biológicas altamente empaquetadas sobre una superficie es muy compleja y su reproducibilidad requiere un control minucioso de las fuerzas que la gobiernan.

El conjunto de interacciones que rigen la formación de estos materiales moleculares auto-ensamblados afectan a las propiedades mecánicas de las moléculas individuales y de la capa como conjunto. Mientras que las propiedades mecánicas de moléculas individuales han sido medidas experimentalmente mediante tecnologías como las pinzas ópticas,^{187,188} las pinzas magnéticas¹⁸⁹ o el AFM,^{190,191} las propiedades mecánicas colectivas de construcciones moleculares, como las SAMs, no

se han estudiado ampliamente de forma experimental hasta la fecha. En este capítulo se demuestra la idoneidad de las palancas para la medida de las fuerzas intermoleculares que tienen lugar en una monocapa de DNA anclada a una micropalanca a través del estudio de su comportamiento dinámico.

5.2 Fuerzas intermoleculares implicadas en una SAM de DNA

La estructura de las SAMs de DNA está gobernada por un balance de diferentes fuerzas no covalentes. Intuitivamente, las fuerzas atractivas estabilizan la capa. Estas interacciones incluyen el apareamiento de Watson y Crick entre bases por puentes de hidrógeno, los puentes de hidrógeno entre bases y fosfatos y el apilamiento entre bases, que es una combinación entre el efecto hidrofóbico de las bases que tratan de evitar su contacto con el agua y las interacciones de van der Waals entre las mismas. Por otra parte, la repulsión electrostática entre fosfatos intra- e intercatenaria tiende a desestabilizar la estructura. Además, el hacinamiento molecular induce una disminución de la entropía conformacional de las cadenas, lo que aumenta su repulsión estérica y, por tanto, su longitud de persistencia (lp).

Estas interacciones han sido simuladas por dinámica molecular (DM)^{128,192,193} por Jesús I. Mendieta Moreno, del grupo de Modelado Molecular del CBMSO (CSIC-UAM). La Figura 5.1 muestra los tres tipos de enlaces atractivos que actúan en una SAM de DNA: a) puentes de hidrógeno entre bases ($H_{\text{base-base}}$); b) puentes de hidrógeno entre bases y fosfatos ($H_{\text{base-p}}$) y c) apilamiento entre bases.

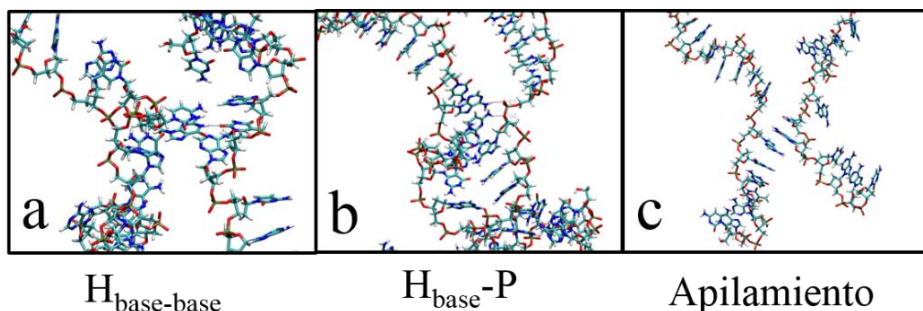


Figura 5.1 | Fuerzas intermoleculares atractivas que actúan en una SAM de ssDNA. Simulaciones por dinámica molecular (DM) de **a)** apareamiento entre bases de Watson y Crick por puentes de hidrógeno, etiquetado como $H_{\text{base-base}}$; **b)** puentes de hidrógeno entre bases y fosfatos, etiquetado como $H_{\text{base-P}}$; y **c)** apilamiento entre bases.

Cuando estos sistemas se encuentran en medio acuoso, debemos considerar una fuerza más: la de solvatación o hidratación. Este tipo de interacción aparece como consecuencia del ordenamiento de las moléculas de agua y depende de la distancia intermolecular.¹⁹⁴ Además, las moléculas de DNA establecen puentes de hidrógeno con el agua, viéndose directamente afectada su longitud de persistencia en función del estado de hidratación¹⁹⁵ (ver Figura 5.2 a)). Por tanto, las cadenas que conforman la SAM se conectan, no sólo a través de interacciones intermoleculares directas, sino a través de la red de moléculas de agua en la que se encuentran inmersas. Dado que uno de nuestros objetivos es el estudio de las propiedades mecánicas de capas de DNA en función de la hidratación, resulta útil representar las SAMs de DNA como una combinación de muelles rígidos, que represente a las moléculas de DNA (ssDNA o dsDNA) y todas las interacciones descritas anteriormente excepto las mediadas por agua, es decir el sistema en estado seco; y

muelles más blandos, que representarían las interacciones mediadas por agua, es decir, el sistema a una humedad relativa $HR > 0\%$ (ver Figura 5.2 b)).

Todas estas interacciones mantienen unidos los componentes moleculares de la capa, dando como resultado una constante elástica efectiva (k_{ef}). Teniendo en cuenta las interacciones implicadas, podemos imaginar la dificultad para predecir el efecto combinado de todas ellas.

En este capítulo se muestra el estudio experimental y teórico del efecto colectivo de las fuerzas intermoleculares que actúan en una SAM de DNA cuando varía la humedad relativa (HR) ambiental y en función de la densidad molecular superficial. Estas fuerzas intermoleculares se traducen en un cambio en las propiedades elásticas del sistema micropalanca – SAM de DNA. La variación de la cantidad de hebras sobre la palanca nos permite modular las interacciones intermoleculares y el volumen de agua que puede acomodarse entre dichas hebras debido a impedimentos estéricos (ver Figura 5.2 c)).

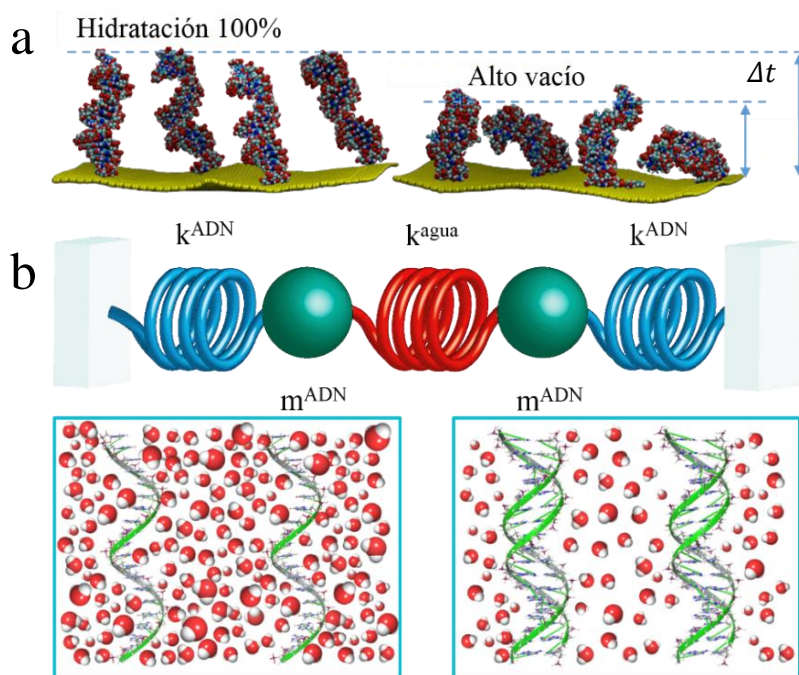


Figura 5.2 | Representación esquemática de efectos derivados de variaciones en la hidratación de moléculas de DNA. **a)** Variación de espesor entre una capa de DNA hidratada y seca debida al cambio en la lp originado por la hidratación. Las imágenes proceden de simulaciones por DM. **b)** Representación del análogo mecánico de las interacciones que actúan en una SAM de DNA. Los muelles azules son los muelles rígidos que representan las moléculas de ssDNA o dsDNA y todas las interacciones descritas excepto las interacciones mediadas por agua (el sistema a $HR = 0\%$). El muelle rojo es el muelle blando que conecta a los muelles rígidos en serie y representa las interacciones mediadas por agua (el sistema a $HR > 0\%$). **c)** Representación de la variación de cantidad de moléculas de agua que se pueden acomodar entre hebras de DNA ancladas en función de los impedimentos estéricos que supone la presencia de hebras extra, ya sea porque las cadenas han hibridado con su complementaria (representado aquí) o porque aumenta la densidad superficial de moléculas de ssDNA. El número de moléculas de agua representado es una estimación basada en las simulaciones de DM de las capas hidratadas.

5.3 Evolución de una SAM de DNA a tiempos de inmovilización crecientes

Desde el punto de vista experimental, con el objetivo de formar SAMs con densidades superficiales crecientes de ssDNA, se han incubado las superficies estudiadas (las matrices de ocho micropalancas de la marca Concentris) con las moléculas de ssDNA tioladas a tiempos crecientes. Se ha utilizado en todo momento la secuencia 5'-CAATGCAGATACACTTTTTT-C₃H₆-SH-3', denominada Oligo1. Los tiempos de inmovilización son: 5 min, 120 min, 360 min, 540 min, 720 min, 1200 min y 1440 min. Posteriormente, se ha realizado una caracterización cuantitativa de las capas formadas en la superficie de las palancas mediante espectroscopía fotoelectrónica de rayos X¹⁹⁶ (XPS)*. Las medidas de XPS fueron realizadas por el Dr. José Luis García Fierro, del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica (ICP, CSIC). Estos estudios se basan en la medida de los picos de emisión de electrones de los átomos superficiales de una muestra. Para la caracterización de capas de DNA se suelen medir los picos de emisión de los átomos de nitrógeno, presentes en las bases nitrogenadas. Sin embargo, dado que los tampones utilizados en la inmovilización del DNA contienen nitrógeno, hemos escogido el fósforo como indicador de la presencia de DNA. Se han

La **espectroscopía fotoelectrónica de rayos X* es un método cuantitativo de análisis de superficies que permite obtener información acerca de las propiedades químicas, físicas y electrónicas de las mismas. La muestra se irradia con un haz de rayos X. Al interaccionar un fotón con un electrón de un átomo de la superficie, se da una transferencia total de energía del fotón hacia el electrón, ocurriendo la emisión del electrón del átomo. Esta técnica es sensible a las primeras capas de la superficie (10nm).¹⁹⁶

analizado los picos de emisión del oro (Au 4f_{7/2}) y del fósforo (P 2p).

La densidad superficial de DNA viene dada por la relación entre el número de átomos de P por unidad de superficie (θ_P) y el número de átomos de P por molécula de DNA anclada ($n_{P\text{Oligo1}}$). El número de átomos de P por unidad de superficie, θ_P , viene dado por el producto de la densidad atómica del P (N_P) por el espesor de la capa, t . La densidad atómica del P, N_P , no se obtiene directamente a partir de las medidas de XPS, sino como la relación atómica entre el P y el Au (N_P/N_{Au}), por lo que se suele utilizar un parámetro más práctico, que es la cobertura relativa de P respecto de Au (θ_P/N_{Au}). La densidad superficial del DNA viene dada por:¹¹⁸ $n_{DNA} = \theta_P/N_{Au} \times N_{Au}/n_{P\text{Oligo1}}$ moléculas/cm². En nuestro caso $n_{P\text{Oligo1}} = 20$, por lo que $n_{DNA} = \theta_P/N_{Au} \times (5.892 \times 10^{22}) \times 10^{-7}/20$ moléculas/cm². 5.892×10^{22} átomos/cm³ es la densidad atómica del Au (N_{Au}) y 10^{-7} es el factor de conversión del espesor de nm a cm. Por tanto, la densidad superficial del DNA se calcula a partir de la ecuación 5.1:

$$n_{DNA} = \theta_P/N_{Au} \times 29.46 \times 10^{13} \text{ moléculas/cm}^2 \quad (5.1)$$

Como se ha mencionado, a partir de los picos de emisión del Au y el P del XPS se obtiene la relación atómica N_P/N_{Au} . Para calcular la cobertura relativa de P respecto de Au (θ_P/N_{Au}) necesitamos multiplicar la relación atómica, N_P/N_{Au} , por el espesor de la capa a cada tiempo de inmovilización. Los espesores a los distintos tiempos de inmovilización han sido obtenidos a partir de la atenuación de los picos de emisión del Au de las superficies con DNA, tomando como referencia el pico de Au de la superficie limpia.

5.3.1 Cálculo del espesor de las SAMs de DNA en vacío

Cuando los electrones procedentes del oro tienen que atravesar la capa de DNA, la intensidad de la emisión se atenúa de acuerdo a la ley de Lambert-Beer.¹¹⁸ A medida que aumenta el tiempo de inmovilización de ssDNA, la atenuación del pico Au 4f_{7/2} es mayor (ver Figura 5.3 a)). En la Figura 5.3 a) se muestran los picos de emisión del oro 4f_{7/2} (izquierda) y 4f_{5/2} (derecha) para una superficie de oro limpia (línea amarilla) y las superficies cubiertas por ssDNA a tiempos crecientes (gradiente de azul claro, para el tiempo más bajo, a azul oscuro, para el tiempo más alto). Por tanto, la intensidad de emisión al atravesar la capa de DNA, I_{Au} , se relaciona con la intensidad de emisión del oro, I_{Au}^0 , de la siguiente manera: $I_{Au} = I_{Au}^0 \exp(-t/L_{Au})$, siendo L_{Au} la longitud práctica efectiva de atenuación. Este parámetro, L_{Au} , se ha calculado de forma empírica tomando como referencia la capa a tiempo de inmovilización 1200 min, cuyo espesor (1,2 nm) hemos medido utilizando AFM. Una vez calculado L_{Au} , se han calculado los espesores para todos los tiempos de inmovilización analizados. Asimismo, se han medido también capas de dsDNA, obtenidas por hibridación con las sondas de ssDNA ancladas previamente, siendo los tiempos de inmovilización de las capas de ssDNA de 120, 960 y 1440 min.

La Figura 5.3 b) muestra los valores de los espesores calculados para las capas de ssDNA (círculos azules) y para las capas de dsDNA (círculos rojos). Las líneas corresponden a los ajustes realizados. Las barras de error tienen en cuenta el error experimental durante la medida de AFM utilizada como referencia. También se muestran los valores

teóricos obtenidos por DM, representados como zonas sombreadas, azul para el ssDNA y roja para el dsDNA.

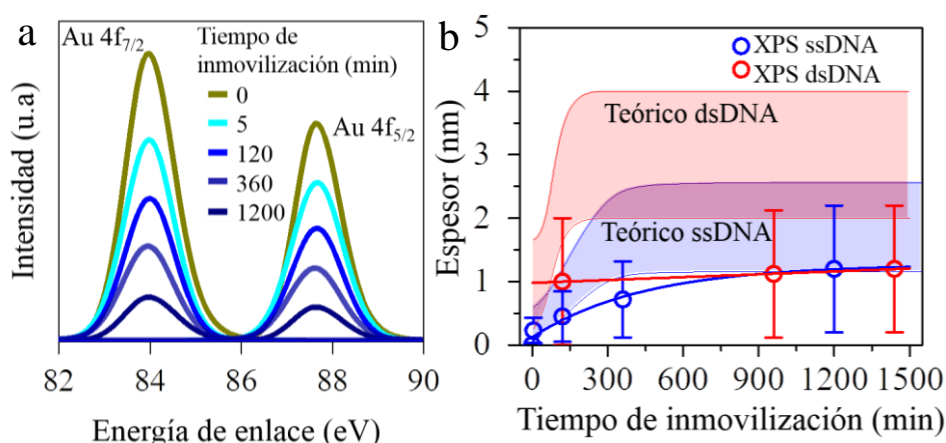


Figura 5.3 | Cálculo del espesor de las SAMs de DNA. a) Picos de emisión del Au 4f obtenidos por XPS para una matriz de oro limpia (línea amarilla) y matrices con ssDNA a tiempos crecientes (gradiente de azules, aumentando el tiempo de claro a oscuro desde 5 min a 1200 min). Para el cálculo del espesor se han utilizado las intensidades de los picos 4f_{7/2}. A medida que aumenta el tiempo de inmovilización, aumenta la densidad y el empaquetamiento de la capa de DNA, atenuando la señal del oro. b) Valores experimentales (círculos) y teóricos (zona sombreada) de los espesores de las capas de ssDNA (azul) y dsDNA (rojo) obtenidos respectivamente mediante XPS y simulaciones de DM.

A tiempos de inmovilización cortos, las cadenas de ssDNA están tumbadas sobre la superficie y colapsadas, debido a la atracción entre las bases y el oro,¹⁹⁷ dando lugar a un espesor que corresponde al diámetro de las bases (0,3 nm). A medida que aumenta el tiempo de inmovilización, el espesor crece de forma asintótica hasta un valor máximo de 1,2 nm, correspondiente a una capa altamente empaquetada

en las superficies estudiadas. A pesar de la discrepancia entre los valores obtenidos por DM y experimentalmente, las tendencias observadas teóricamente son coherentes con las medidas experimentales.

Los espesores experimentales del dsDNA apenas varían con el tiempo de inmovilización. En este caso, los valores experimentales y teóricos muestran mayor discrepancia, siendo los valores teóricos en torno a 2 nm superiores. Una posible explicación es la baja eficiencia de hibridación en superficie, especialmente en capas con alta densidad de empaquetamiento. Mientras que en las simulaciones se ha considerado una eficiencia de hibridación del 100%, experimentalmente se ha demostrado que con densidades de empaquetamiento del ssDNA del orden de $10^{13} \text{ moléculas/cm}^2$, rango en el que nos encontramos, es tan solo del 10%.¹⁵⁴ Los resultados experimentales muestran una dependencia con el tiempo de inmovilización despreciable. Como veremos a continuación, el tiempo de inmovilización está relacionado directamente con la densidad superficial, mientras que la eficiencia de hibridación se relaciona de manera inversa con la densidad superficial. A bajas densidades, el porcentaje de hibridación es mayor, lo que contribuye a aumentar el espesor de la capa debido a la lp del dsDNA. A altas densidades la hibridación es menor, pero las cadenas de ssDNA se mantienen más levantadas debido al hacinamiento molecular. En los resultados teóricos vemos una gran dependencia del tiempo de inmovilización a tiempos cortos (0 – 200 min), lo que puede ser explicado por la contribución de la superficie limpia al valor medio del espesor calculado por DM.

5.3.2 Cálculo de la densidad superficial de las SAMs de DNA a partir de medidas de XPS realizadas en vacío.

Una vez calculados los espesores, obtenemos la cobertura relativa de P (θ_P/N_{Au}) a partir del producto del espesor de la capa por la densidad atómica del P respecto del Au, y calculamos la densidad superficial de ssDNA tal y como se ha explicado anteriormente. La Tabla 5.1 muestra los valores de espesor, densidad atómica del P respecto del Au obtenidos a partir de los picos de emisión con XPS, la cobertura relativa de P (θ_P/N_{Au}) y la densidad superficial para cada tiempo de inmovilización de ssDNA.

Tiempo de incubación (min)	Espesor capa ssADN (nm)	Densidad atómica de P respecto de Au (N_P/N_{Au})	Cobertura relativa de P (θ_P/N_{Au})	Densidad superficial ssADN n_{ADN} (moléculas/cm ²)
5	0,2286	0,02101	0,00480	$1,39255 \times 10^{12}$
120	0,4260	0,07359	0,03135	$9,09113 \times 10^{12}$
360	0,7339	0,17255	0,12664	$3,67243 \times 10^{13}$
540	0,8955	0,17988	0,16108	$4,67133 \times 10^{13}$
720	1,0140	0,18045	0,18298	$5,30640 \times 10^{13}$
1200	1,2000	0,18050	0,21660	$6,28140 \times 10^{13}$
1440	1,2503	0,18050	0,22568	$6,54469 \times 10^{13}$

Tabla 5.1 | Cálculo de la densidad superficial de ssDNA.¹¹⁸

De acuerdo con trabajos previos,¹⁹⁸ hemos visto cómo a medida que aumenta el tiempo de inmovilización, aumenta la densidad superficial de moléculas de ssDNA y, con ello, las interacciones intermoleculares, que hacen que las moléculas adopten una conformación extendida y se alejen de la superficie, aumentando el espesor de la capa. La Figura 5.4 a)

muestra de forma gráfica la densidad superficial de ssDNA en función del tiempo de inmovilización.

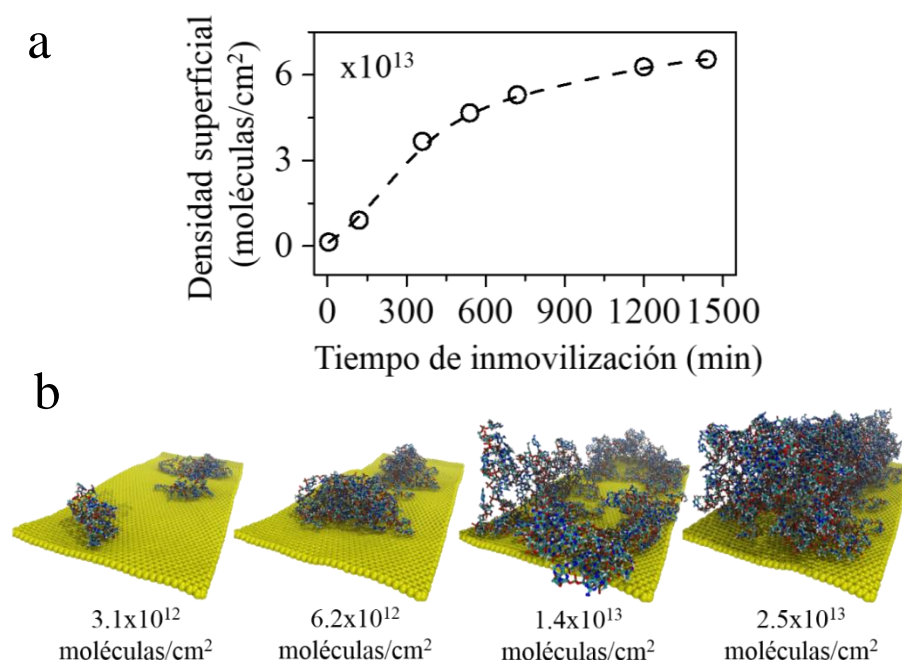


Figura 5.4 | Densidad superficial del ssDNA inmovilizado sobre palancas.

a) Estimación de la densidad superficial a partir de las medidas de XPS en función del tiempo de inmovilización. Observamos que se llega a la saturación a una densidad aproximada de $6,5 \times 10^{13}$ moléculas/cm². **b)** Simulación por DM del incremento de densidad superficial de ssDNA anclado a una superficie. La densidad se ha aumentado de 4 a 32 moléculas en el área simulada de 136 nm², que equivale a un aumento de la densidad de 3.1×10^{12} moléculas/cm² a 2.5×10^{13} moléculas/cm². El DNA se encuentra en estado de total hidratación y se ancla de forma aleatoria a la superficie. Se observa el aumento de espesor de la capa.

La Figura 5.4 b) muestra la variación del espesor de la capa de DNA cuando se simula por DM un aumento de la densidad superficial de moléculas de ssDNA ancladas aleatoriamente a una superficie. La

simulación se ha realizado en condiciones de plena hidratación. A la densidad inicial de 3.1×10^{12} *moléculas/cm²* las moléculas se encuentran tumbadas sobre el sustrato. Al ir aumentando el ángulo que forman las cadenas con la superficie, el espesor de la capa aumenta, hasta un valor máximo alcanzado a una densidad simulada de 2.5×10^{13} *moléculas/cm²*.

5.4 Caracterización mecánica de las capas de ssDNA

Una vez caracterizada la densidad superficial molecular de las capas de DNA en función del tiempo de inmovilización, hemos estudiado la respuesta mecánica de las palancas. Se ha analizado tanto la tensión superficial como el cambio de frecuencia de resonancia con ciclos de HR, de 0 a 70%, de palancas funcionalizadas a densidades superficiales crecientes. También se ha estudiado la respuesta de las mismas palancas tras su incubación con las secuencias de DNA complementarias.

Los primeros experimentos se realizaron siguiendo el protocolo de limpieza y funcionalización de las palancas descrito para los Capítulos 3 y 4. Dada la baja reproducibilidad de las medidas dinámicas observada, se evaluaron diferentes protocolos de limpieza. La eliminación del paso de aclarado con agua previo al tratamiento con UV permitió obtener una elevada reproducibilidad de las medidas dinámicas.

Tal y como se ha explicado en capítulos anteriores, los sensores nanomecánicos ofrecen la posibilidad de medir dos modos de operación, el dinámico y el estático, lo cual resulta útil para el estudio de interacciones moleculares desde dos perspectivas diferentes. La medida simultánea de ambos modos permite reducir el tiempo de análisis. Sin

embargo, debido a que la respuesta del PSD no es uniforme a lo largo de su superficie, la deflexión de la palanca induce cambios artefactuales sobre la frecuencia medida. La medida de ambos modos sin artefactos se ha llevado a cabo gracias a la utilización de un sistema de posicionamiento del haz láser mediante espejos retroalimentados (ver Capítulo 2). La frecuencia de resonancia fundamental de las palancas es de 5kHz aproximadamente, con un factor de calidad en torno a 20 y una fluctuación de la frecuencia de apenas 50 mHz. La Figura 5.5 muestra el bajo nivel de ruido (a) y un espectro termomecánico medido con el PLL (b).

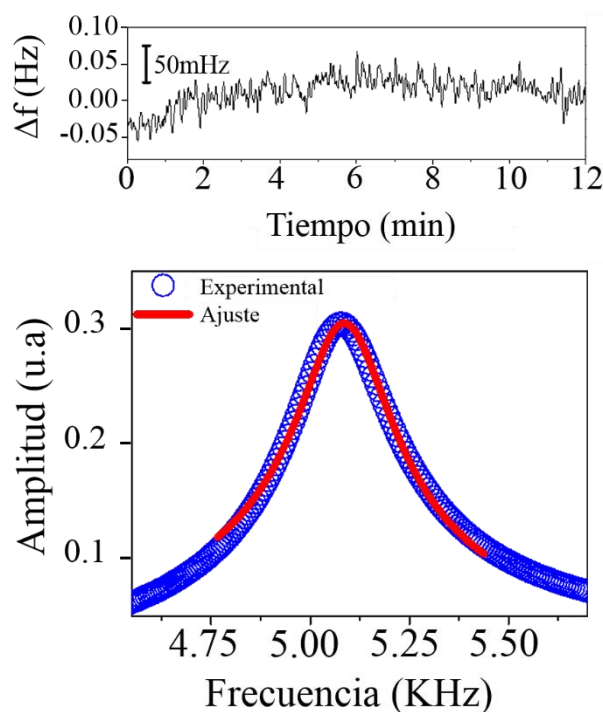


Figura 5.5 | Medida de la frecuencia de resonancia. a) Ruido en frecuencia. **b)** Pico de frecuencia de resonancia fundamental de una de las micropalancas utilizadas.

La Figura 5.6 a) muestra la respuesta estática con un ciclo de HR (de 0 a 70%) de diferentes palancas funcionalizadas a tiempos de inmovilización crecientes: 0, 5, 120, 360, 540, 720, 1200 y 1440 min (gradiente de líneas azules de claro, para el menor tiempo, a oscuro, para el mayor tiempo). Como se puede apreciar, el comportamiento de la tensión superficial con el tiempo de inmovilización es monótono: al aumentar la densidad superficial molecular, aumenta la tensión superficial de la palanca. Para un tiempo de inmovilización de 5 min observamos una tensión superficial de -70 mN/m en el estado de máxima hidratación. La tensión superficial va aumentando hasta valores de -600 mN/m a 70% de HR para un tiempo de inmovilización de 24 h. También se muestra la curva de una palanca no funcionalizada (línea amarilla). Como ya se ha visto en capítulos anteriores, estas curvas presentan histéresis.

Simultáneamente hemos medido el cambio de frecuencia del modo fundamental de vibración de las mismas palancas en función de la humedad (Figura 5.6 b)), gradiente de rojos de claro, para el menor tiempo, a oscuro, para el mayor tiempo). Se muestra la variación de frecuencia de resonancia durante el ciclo de hidratación y deshidratación: $\Delta f_{(HR)} = f_{(HR)} - f_{(0\%)}$. En comparación con la respuesta estática, vemos que estas curvas presentan un comportamiento en función de la densidad superficial que no es monótono. A tiempos de inmovilización bajos y, por tanto, a baja densidad, el cambio de frecuencia sigue una tendencia descendente con respecto al cambio que muestra la capa de oro limpia, alcanzando un mínimo a 120 min de incubación. Desde este punto la tendencia se invierte y crece hasta alcanzar un cambio de frecuencia ligeramente menor al del oro desnudo. Esta dependencia no

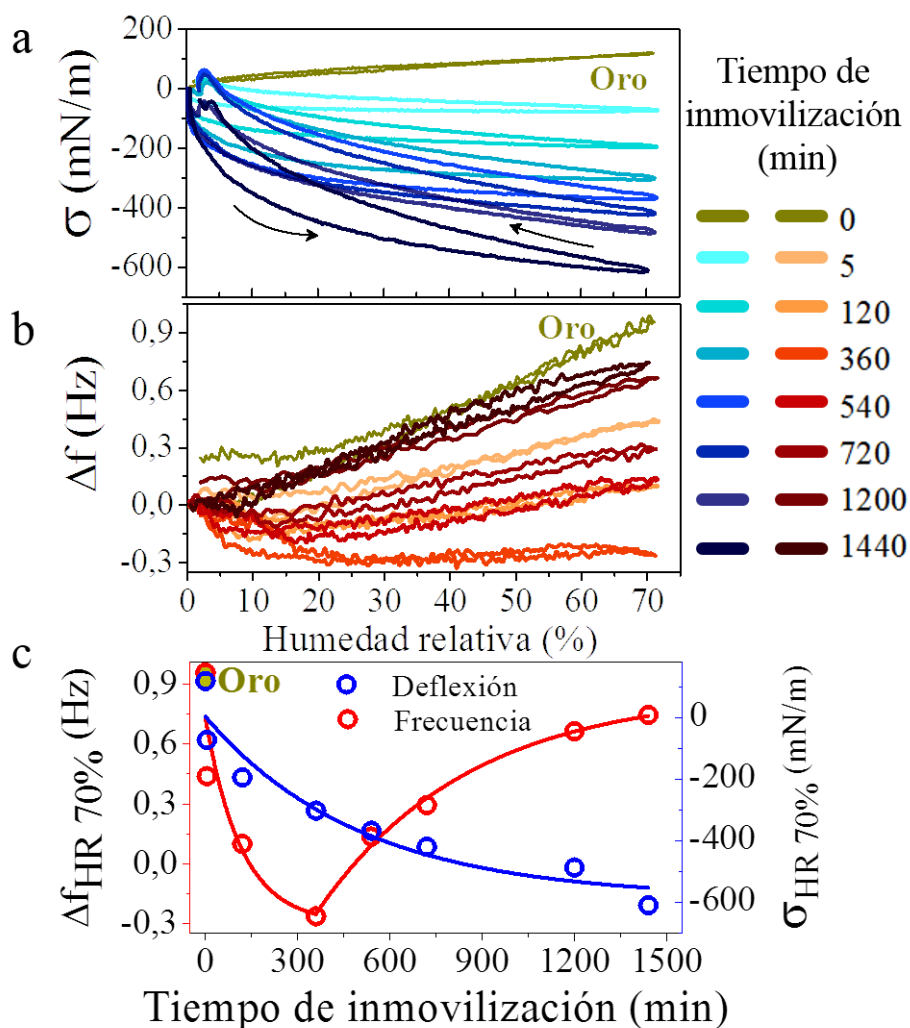


Figura 5.6 | Respuesta mecánica estática y dinámica con la hidratación de palancas funcionalizadas a densidades crecientes de ssDNA. a) Tensión superficial de las palancas a densidades crecientes de ssDNA (líneas azules, de claro, para baja densidad, a oscuro, para alta densidad) frente a la HR. Se muestra también la respuesta de una palanca sin funcionalizar (línea amarilla). La tensión superficial se mide con respecto al estado de la palanca a HR de 0%. b) Variación de la frecuencia de resonancia fundamental en función de la HR de las palancas funcionalizadas a densidades crecientes de ssDNA (líneas rojas, de claro, para baja densidad, a oscuro, para alta densidad). Se muestra también

la respuesta de una palanca sin funcionalizar (línea amarilla). Las medidas fueron tomadas de forma simultánea a las mostradas en a) para cada palanca y tiempo de incubación. c) Valores de tensión superficial y cambio de frecuencia entre 0% de HR y el estado de máxima hidratación (70%) en función del tiempo de inmovilización.

monótona de la frecuencia de resonancia con el tiempo de inmovilización (un descenso seguido de un aumento) es un claro indicativo de la existencia de dos mecanismos opuestos actuando al mismo tiempo.

Como se ha mencionado en el Capítulo 1, la frecuencia de resonancia se puede entender como un balance energético entre la energía cinética y la potencial. La energía cinética de la palanca viene dada por $E_c = \frac{1}{2}mv^2$, donde m es la masa efectiva de la palanca y v la velocidad de oscilación, directamente relacionada con la frecuencia; y la energía potencial se aproxima como $E_p = \frac{1}{2}kz_{max}^2$, donde k es la constante elástica de la palanca y z_{max} la amplitud de oscilación. Mientras que la energía cinética se ve afectada únicamente por la masa del resonador, la energía potencial está relacionada con la rigidez del mismo.⁶⁴ Estos resultados sugieren una preponderancia del efecto de la masa a bajas densidades, debida al aumento de moléculas de ssDNA, y una dominancia del efecto de la rigidez a altas densidades, debida al aumento de las interacciones al disminuir las distancias intermoleculares. Por otra parte, podemos apreciar que la histéresis en estas curvas es despreciable, lo que tiene implicaciones que se discutirán más adelante.

La Figura 5.6 c) muestra los valores de tensión superficial (círculos azules) y de cambio de frecuencia (círculos rojos) entre 0% de HR y el

estado de máxima hidratación (70% HR) en función del tiempo de inmovilización. Se aprecia claramente la tendencia monótona de la respuesta estática y no monótona de la respuesta dinámica. Las líneas son simplemente una guía visual.

Como se ha explicado en el Capítulo 1, la frecuencia de resonancia de un resonador, Δf , se puede aproximar por la ecuación (5.2), por lo que depende de la masa efectiva de la palanca, m , y la rigidez de la misma, dada por la constante elástica, k . A su vez, la constante elástica, k , ecuación (5.3), depende del módulo de Young, E ; de la geometría del resonador, siendo L la longitud, w la anchura y t el espesor; y del modo de vibración, cuya constante β_n para el primer modo de vibración, también llamado modo fundamental, vale $\beta_1 = 1.8751$.

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}} \quad (5.2)$$

$$k = \frac{Ewt^3}{12L^3} \beta_n^4 \quad (5.3)$$

De los parámetros que afectan a la k , son variables en este caso el espesor de la capa y el módulo de Young, cuyo comportamiento analizaremos a continuación.

5.4.1 Variación del espesor en función de la densidad superficial de DNA

En la Figura 5.7 se muestran los espesores teóricos obtenidos por DM de las capas de ssDNA (azul) y dsDNA (rojo) en función del tiempo de inmovilización en estado de total hidratación. Además, se muestran en cada gráfica los espesores teóricos en estado seco (negro). La región sombreada en ambas gráficas corresponde al error teórico obtenido al

analizar la media y desviación de las alturas de las moléculas contenidas en toda la celda de simulación.

Como se menciona al principio de este capítulo, el espesor de las capas de ssDNA (Figura 5.7 a)) crece de forma asintótica tanto en seco (negro) como en estado de hidratación (azul) al aumentar la densidad superficial de DNA debido a progresiva la disminución de las distancias intermoleculares y el aumento de las interacciones entre las cadenas y los impedimentos estéricos. El espesor máximo teórico en estado de total hidratación es de ~ 2.7 nm.

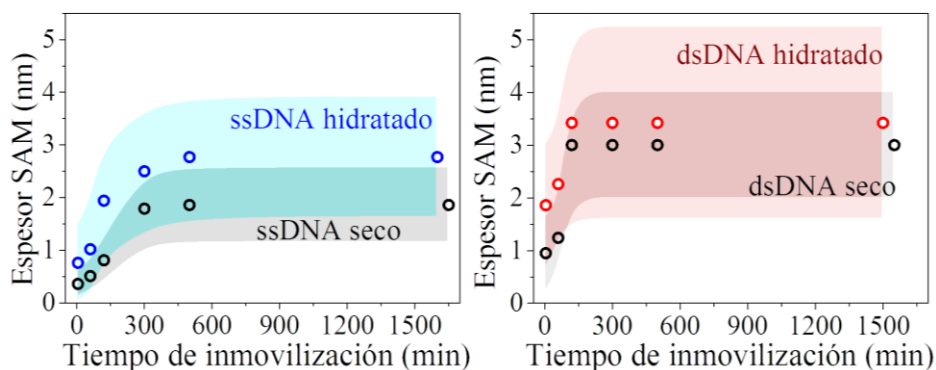


Figura 5.7 | Variación del espesor con la hidratación en función de la densidad superficial de DNA. a) Espesor teórico obtenido por DM para el ssDNA en estado hidratado (azul) y seco (negro). La zona sombreada corresponde al error teórico. **b)** Espesor teórico obtenido por DM para el dsDNA en estado hidratado (rojo) y seco (negro). La zona sombreada corresponde al error teórico.

En el caso del dsDNA (Figura 5.7 b)) observamos que el espesor es independiente del tiempo de inmovilización a partir de 120 min de inmovilización (equivalente a una densidad $\sim 6 \times$

10^{12} moléculas/cm²). Como se ha discutido previamente, la acusada dependencia con el tiempo de inmovilización observada a tiempos cortos (0 – 200 min), puede ser explicada por una gran contribución de la superficie limpia, que contribuye a disminuir el valor medio de espesor. El espesor máximo teórico en estado de total hidratación es de ~ 3.5 nm.

5.4.2 Variación del módulo de Young con la hidratación de DNA

Vamos a analizar ahora cómo se comporta el módulo de Young efectivo de la capa de DNA, E_{ef}^{DNA} . Éste ha sido calculado a partir de las curvas de frecuencia y considerando algunos parámetros obtenidos por DM, y también exclusivamente a partir de las simulaciones realizadas por DM. Los cálculos han sido realizados por el Dr. Daniel Ramos, del Instituto de Microelectrónica de Madrid (CSIC).

El módulo de Young (E) es una propiedad mecánica de los cuerpos elásticos que define el estiramiento o compresión de un material en función de la fuerza que se aplica. Este parámetro refleja la rigidez media de los enlaces moleculares de dicho material. En una SAM de DNA, su elasticidad está necesariamente ligada a los enlaces intermoleculares.

5.4.2.1 Cálculo del módulo de Young efectivo de la capa de DNA a partir de las medidas de frecuencia de resonancia

A partir de las medidas experimentales de frecuencia, se ha calculado el módulo de Young efectivo de la capa de DNA, E_{ef}^{DNA} , en función de la hidratación para cada densidad superficial de DNA estudiada. Para estos cálculos^{199,200} se tienen en cuenta las propiedades

mecánicas de la palanca: densidad de masa, dimensiones geométricas y módulo de Young del silicio; así como el espesor teórico de la capa biológica y la densidad de masa del DNA, ρ^{DNA} . Para calcular la densidad de masa de la capa de DNA se ha tenido en cuenta el número de moléculas de agua por hebra de DNA para cada densidad superficial, calculado por DM. Para tener en cuenta las dinámicas de hidratación, los ciclos de hidratación/deshidratación se han simulado con un barrido lineal del número de moléculas de agua desde 0 hasta el máximo calculado por DM para cada densidad superficial. Aunque se sabe que la dinámica de hidratación viene descrita por la ecuación de Brunauer-Emmett-Teller,²⁰¹ se ha demostrado recientemente que una variación lineal del número de moléculas de agua constituye una buena aproximación.²⁰² La variación de espesor con la hidratación para cada densidad superficial de DNA se ha calculado a partir de la variación de espesor teórica entre el estado seco e hidratado. Asumiendo que el espesor de la capa de DNA (~ 1 nm) es tres órdenes de magnitud menor que el espesor de las palancas (~ 1 μ m), podemos escribir la frecuencia de resonancia en serie de potencias quedándonos en el segundo término en el espesor (ecuación 5.4):¹⁹⁹

$$\Delta f/f_0 \cong 1/2 \left(3 E_{ef}^{DNA}/E_c - \rho^{DNA}/\rho_c \right) (t^{DNA}/t_c) + 3/8 \left[(\rho^{DNA}/\rho_c)^2 + 2 E_{ef}^{DNA}/E_c (4 - \rho^{DNA}/\rho_c) - 7 (E_{ef}^{ADN}/E_c)^2 \right] (t^{DNA}/t_c)^2 \quad (5.4)$$

donde el subíndice c se refiere a la palanca, siendo E_c el módulo de Young del silicio, 169 GPa; ρ_c la densidad de masa del silicio, $2330 \text{ kg} \times \text{m}^{-3}$, y t_c el espesor, 1 μ m. El módulo de Young efectivo de cada capa de DNA, E_{ef}^{DNA} , se ha obtenido resolviendo esta expresión para cada caso particular. Por tanto, para cada densidad superficial de DNA,

a la cual tenemos un valor de densidad de masa del DNA, ρ^{DNA} , y un espesor, tenemos una curva que representa cómo varía el módulo de Young efectivo de la capa de DNA, E_{ef}^{DNA} , en función de la hidratación y deshidratación de la misma (Figura 5.8). Las densidades moleculares superficiales (calculadas por XPS) van desde $0.1 \times 10^{13} \text{ moléculas/cm}^2$ hasta $6.5 \times 10^{13} \text{ moléculas/cm}^2$. Se ha calculado el E_{ef}^{DNA} para las capas de ssDNA y para las capas de dsDNA.

En la Figura 5.8 a) se muestra el módulo de Young de las capas de ssDNA. E_{ef}^{DNA} aumenta de forma lineal con la HR, lo que indica un aumento de la rigidez de la capa debida a la hidratación. Por una parte, la hidratación de las moléculas de DNA disminuye su lp , lo que aumenta su espacio conformacional y, con ello, las interacciones intermoleculares establecidas con otras cadenas. Además, todas las moléculas se conectan entre sí por una red de puentes de hidrógeno establecidos entre las moléculas de agua, lo que contribuye a tensar la capa (recordemos el análogo mecánico de los muelles). El módulo de Young, E_{ef}^{DNA} , aumenta a medida que aumenta la densidad superficial de DNA, tanto en estado plenamente hidratado como en seco (gradiente de azules de claro, para bajas densidades, a oscuro, para altas densidades). El módulo de Young en estado seco aumenta desde 0, para densidades moleculares bajas, hasta $\sim 10 \text{ GPa}$, para densidades mayores. Esto es debido a las interacciones intermoleculares que van apareciendo entre las cadenas de ssDNA al disminuir la distancia molecular, incluso estando las moléculas de DNA colapsadas, como ocurre a 0% de HR. Es importante destacar que las curvas no presentan histéresis, lo que indica una alta capacidad de ajuste de la elasticidad de la capa variando la humedad relativa en una posible aplicación que requiera la modulación de las

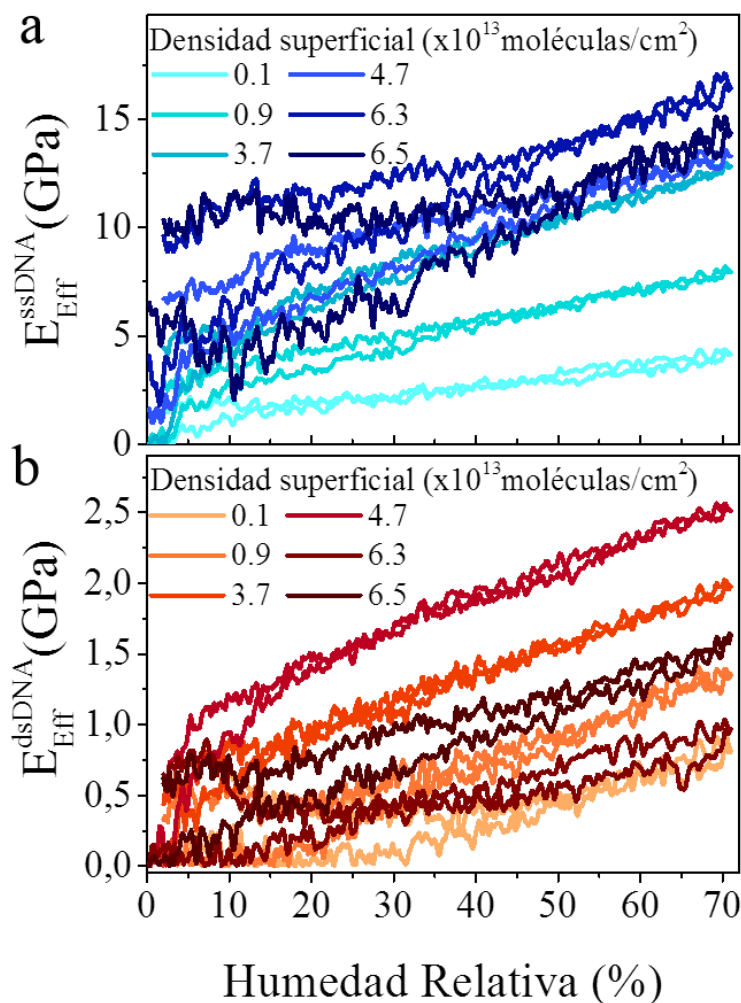


Figura 5.8 | Modulación del módulo de Young efectivo de la capa de DNA.

Representación de la variación del módulo de Young, obtenido a partir de las medidas de frecuencia y datos de DM, del ssDNA (a) y dsDNA (b) durante un ciclo de hidratación y deshidratación para palancas inmovilizadas con densidades crecientes de moléculas de DNA. El cálculo del módulo de Young efectivo a partir del cambio de frecuencia de resonancia se detalla en el texto. El módulo de Young efectivo para el dsDNA es un orden de magnitud menor y menos sensible a la variación de HR debido al efecto de apantallamiento de la doble hélice.

propiedades mecánicas de un material biológico. Es particularmente relevante, la medida tomada a 3.7×10^{13} moléculas/cm², que muestra una variabilidad de módulo de Young de aproximadamente 10 GPa, desde 5 a 15 GPa, para una variación de HR de 0 a 70 %. Dado que es la capa que mayor variación de módulo de Young presenta, podemos concluir que esta densidad de empaquetamiento maximiza las interacciones intermoleculares mediadas por agua. A densidades de inmovilización superiores, el módulo de Young en estado seco aumenta (7 – 10 GPa) debido a las interacciones directas entre las cadenas de DNA, pero su variabilidad con la humedad es menor; lo cual interpretamos como que los impedimentos estéricos dificultan la entrada del agua entre las moléculas de DNA. Las simulaciones por DM predicen esta disminución de cantidad de moléculas de agua por hebra de ssDNA al aumentar la densidad superficial (Figura 5.9).

La Figura 5.8 b) muestra las curvas de módulo de Young para las mismas palancas representadas en la Figura 5.8 a), pero tras la hibridación con la secuencia complementaria (gradiente de rojos de claro, para bajas densidades de ssDNA, a oscuro, para altas densidades). Como se puede ver, el comportamiento elástico de las capas de dsDNA es muy diferente. La doble hélice produce un efecto de apantallamiento de las interacciones intermoleculares atractivas entre las cadenas de DNA. Además, debido a impedimentos estéricos, entre las cadenas se acomoda un menor número de moléculas de agua, de acuerdo con las simulaciones por DM, disminuyendo así la cantidad de puentes de hidrógeno establecidos en la red que forma el solvente. Todo ello se traduce en un módulo de Young un orden de magnitud menor para la capa hibridada, respecto a la capa de ssDNA para la misma densidad de inmovilización. Esto se produce tanto en estado de máxima hidratación

(el mayor E para el dsDNA es de 2.5 GPa, frente a los ~15 GPa que muestra el ssDNA), como en estado seco (por debajo de 2 GPa para todas las densidades superficiales medidas).

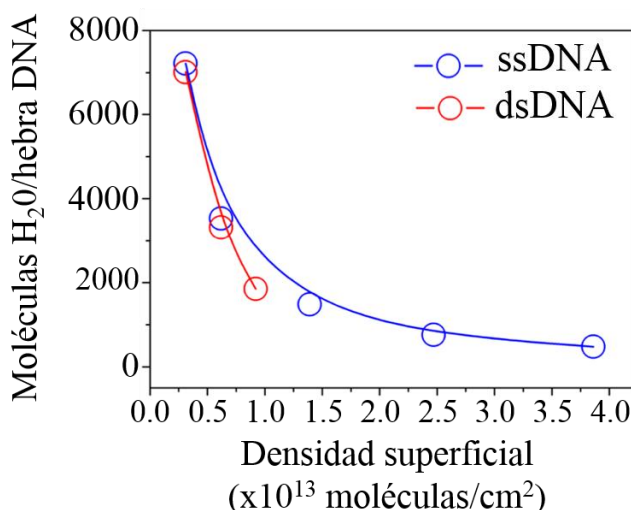


Figura 5.9 | Simulaciones por DM del número de moléculas de agua por hebra de DNA. En el estado de plena hidratación, el número de moléculas de agua que rodea las moléculas de DNA depende de la densidad superficial de DNA, disminuyendo a medida que la densidad aumenta (ssDNA: círculos azules, dsDNA: círculos rojos).

5.4.2.2 Cálculo teórico del módulo de Young efectivo de la capa de DNA

Para dar cuenta de la coherencia entre los resultados experimentales y teóricos, se muestran los valores teóricos del módulo de Young, representados como áreas sombreadas en la Figura 5.10 (azul para el ssDNA, roja para el dsDNA). Para calcular la rigidez de una monocapa de DNA a medida que aumenta su densidad superficial y, por tanto, las interacciones intermoleculares, se ha simulado una lámina de un material

inerte (grafeno) a la que se encuentran ancladas las moléculas de DNA en sitios aleatorios y en número creciente y se ha analizado el coste energético requerido para doblar la lámina. La derivada segunda de las curvas de energía de deflexión obtenidas nos da la constante elástica del sistema, $k_{ef}^{DNA-graf}$, que es utilizada para calcular el módulo de Young efectivo de la capa de DNA, E_{ef}^{DNA} .¹³⁶ Los cálculos han sido realizados para capas de DNA en estado de plena hidratación.

5.4.3 Variación del módulo de Young con la densidad superficial de DNA

La Figura 5.10 muestra el módulo de Young efectivo al 70% de HR en función de la densidad superficial analizada para el ssDNA (círculos azules) y dsDNA (círculos rojos), obtenido a partir de las curvas mostradas en las Figuras 5.8 a) y 5.8 b).

El ajuste experimental de los datos mostrados en la Figura 5.10 da un valor de $E_{ef}^{ssDNA} = 1.5 / (1.22 \times 10^{-10} + 2.29 \times 10^{-9} e^{-1.42 \times 10^{13} n_{DNA}}) \text{ GPa}$ para el ssDNA; y de $E_{ef}^{dsDNA} = 4.59 \times 10^6 + 1.35 \times 10^{-6} n_{DNA} \text{ GPa}$, para el dsDNA. Como hemos visto, E_{ef}^{DNA} aumenta con la densidad superficial. Sin embargo, mientras que en el caso de la capa de ssDNA se alcanza un máximo asintótico de 15 GPa, el módulo de Young efectivo para el dsDNA es un orden de magnitud menor, $\sim 2 \text{ GPa}$. El error experimental corresponde a la variabilidad obtenida para todas las palancas analizadas a cada densidad superficial.

El área sombreada corresponde al error teórico procedente de los parámetros de ajuste en la determinación de los módulos de Young a partir de las simulaciones por DM.

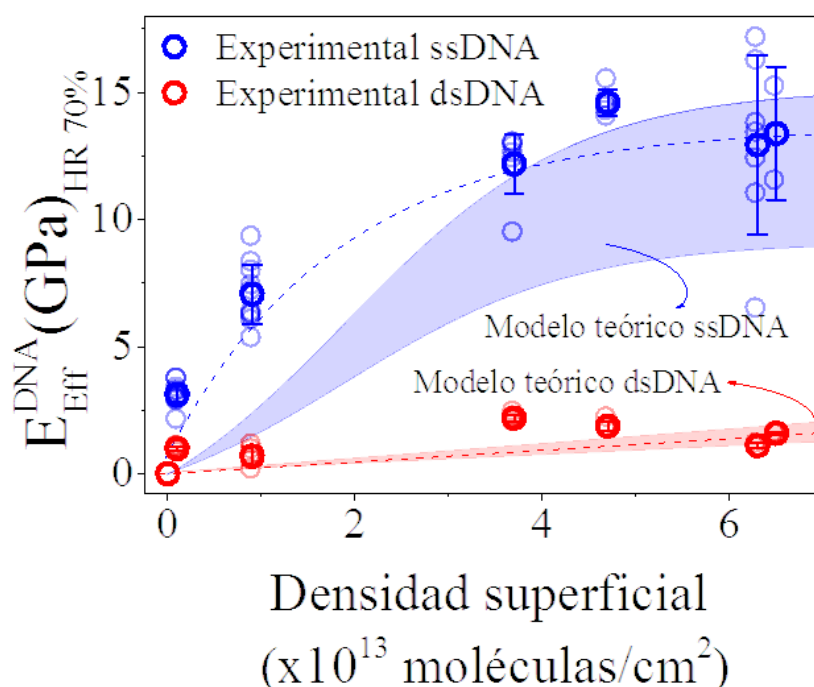


Figura 5.10 | Valores experimentales y teóricos de módulo de Young para las capas de ssDNA y dsDNA totalmente hidratadas en función de la densidad superficial molecular. Los cálculos teóricos (zona sombreada) son coherentes con los datos experimentales.

5.5 Propiedades mecánicas de las SAMs de DNA en función de su densidad superficial

Hemos observado que el cambio de frecuencia de resonancia de las palancas varía en función de la densidad superficial de DNA y sigue una tendencia no monótona. Esta tendencia se explica por la distinta contribución de los efectos de masa, espesor y módulo de Young. En la

Figura 5.11 se muestran los valores de Δf al 70% de HR medidos experimentalmente en función de la densidad superficial de las capas de ssDNA y de las mismas capas tras su hibridación. Los valores han sido referenciados respecto del Δf al 70% de HR de la palanca de oro sin funcionalizar ($f_{DNA} - f_{oro}$).

A bajas densidades de empaquetamiento las interacciones entre las cadenas de ssDNA son casi despreciables, por lo que el efecto del módulo de Young y del espesor en la frecuencia a estas densidades es inapreciable. Observamos que la frecuencia de resonancia disminuye debido a la masa añadida de las moléculas de ssDNA. A medida que la densidad superficial aumenta, la distancia intermolecular disminuye y las fuerzas intermoleculares aumentan. Esto provoca un aumento tanto del espesor como del módulo de Young de la capa de ssDNA, aumentando la rigidez del sistema palanca-DNA y provocando, consecuentemente, un aumento de la frecuencia de resonancia. La densidad superficial crítica en la que la rigidez compensa el cambio negativo de la frecuencia debido al aumento de masa ocurre a un 30% de la cobertura máxima (aproximadamente a $2.5 \times 10^{13} \text{ moléculas/cm}^2$). Las líneas azul y rojas en la Figura 5.11 representan el cambio de frecuencia de resonancia simulado por elementos finitos (FEM). Con el fin de reproducir los resultados experimentales, se ha simulado la respuesta de un resonador nanomecánico que presenta una capa anclada de espesor, módulo de Young y densidad, ρ , variables, en función de la densidad superficial molecular. El resonador presenta la misma geometría que las palancas utilizadas. Las simulaciones han sido realizadas por el Dr. Daniel Ramos, del Instituto de Microelectrónica de Madrid (CSIC).

Mientras que el cambio de frecuencia para el ssDNA muestra un comportamiento no monótono, el dsDNA muestra un comportamiento monótono negativo con la densidad superficial, debido a que tanto el espesor como el módulo de Young se mantienen relativamente constantes y lo único que varía es el aumento de la masa.

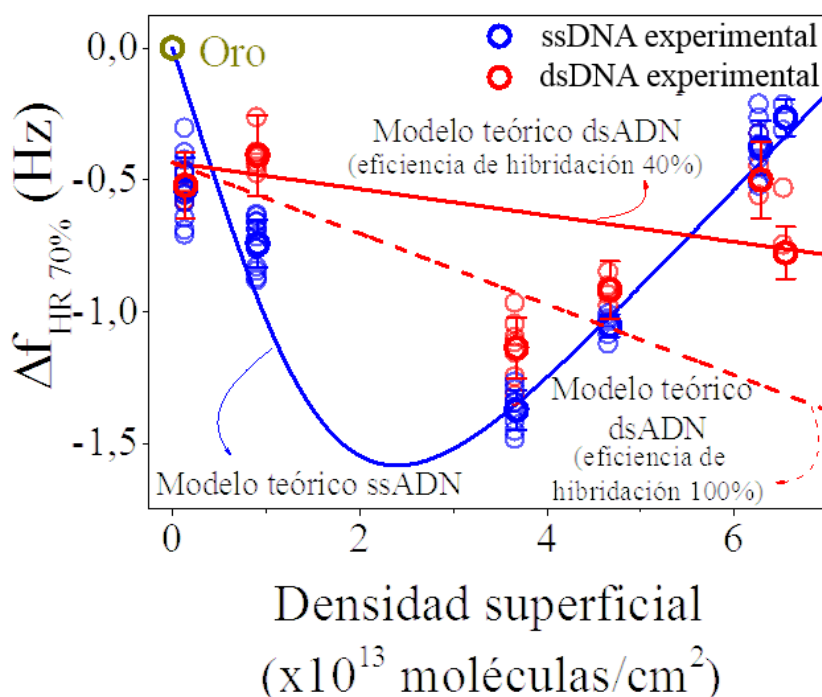


Figura 5.11 | Cambio de frecuencia de resonancia en función de la densidad superficial de DNA. Predicción teórica (líneas) y medidas experimentales (símbolos) de los cambios de frecuencia para el DNA totalmente hidratado (ssDNA azul, dsDNA rojo). La discrepancia entre los valores experimentales obtenidos con el dsDNA y el cambio de frecuencia teórico calculado (línea punteada) puede ser atribuida a la variabilidad de la eficiencia de hibridación al aumentar la densidad superficial. Dejando libres los parámetros de ajuste podemos estimar una eficiencia de hibridación del 40 % y una adsorción inespecífica del 15 %.

A densidades comprendidas entre $10^{12} - 5 \times 10^{13}$ *moléculas/cm²* lo que marca la diferencia entre las capas de ssDNA y dsDNA es el aumento de espesor debido al aumento de la *lp* del dsDNA. Consecuentemente, la frecuencia de resonancia mostrada por las palancas con dsDNA aumenta. A densidades elevadas ($> 5 \times 10^{13}$ *moléculas/cm²*) la variación de espesor entre el ssDNA y el dsDNA es menor, y el módulo de Young de la capa de dsDNA es un orden de magnitud menor que el módulo de Young de la capa de ssDNA, por lo que no tiene un efecto apreciable sobre la frecuencia. Por tanto, observamos un efecto puro de masa con el consecuente descenso de la frecuencia de resonancia. La discrepancia entre los resultados experimentales y el cambio de frecuencia teórico simulado por FEM para la capa hibridada (línea roja punteada) puede ser atribuida a la inherente dependencia de la eficiencia de hibridación experimental con la densidad de ssDNA,¹⁵⁴ disminuyendo la eficiencia al aumentar la densidad. En el modelo teórico se ha asumido una capa hibridada al 100%. La línea roja sólida representa un ajuste alternativo de los valores experimentales dejando libres dos parámetros: la eficiencia de hibridación y la masa añadida. El resultado del ajuste corresponde a una eficiencia de hibridación del 40 % y un exceso de masa, atribuido a adsorción inespecífica, del 15 %. Como puede verse en la Figura 5.11, los valores experimentales no contradicen las tendencias teóricas, teniendo en cuenta las limitaciones descritas. La dependencia de la frecuencia de resonancia y del E_{ef}^{DNA} con la densidad superficial apoya la hipótesis de que la variación del módulo de Young observada con la humedad procede del efecto de las fuerzas intermoleculares mediadas por el agua, como apuntan también las simulaciones de DM.

5.6 Conclusiones

En este capítulo se muestra el efecto de las fuerzas intermoleculares originadas en monocapas de DNA en las frecuencias medidas de las palancas a las cuales se encuentran ancladas las capas.

Las variaciones en el estado de hidratación y en la densidad superficial influyen sobre las interacciones intermoleculares y, por tanto, sobre la respuesta dinámica.

Las capas de ssDNA presentan una variabilidad en el módulo de Young, y por tanto en su elasticidad, de hasta 10 GPa, en función de su estado de hidratación. Esta propiedad puede ser de gran utilidad en muchas aplicaciones, desde el diseño de interruptores moleculares sensibles a la humedad²⁰³ al desarrollo de superficies con rigidez modulable para el control de la adhesión celular y estudios de estimulación mecánica, de forma similar a las desarrolladas actualmente con otros polímeros sensibles a estímulos, que reciben cada vez más atención.^{204,205}

El método desarrollado también puede ser utilizado como un sensor de hibridación para la detección de DNA, dado el cambio significativo en el módulo de Young de una capa de ssDNA frente a una de dsDNA, siendo un orden de magnitud diferente, que se traduce en una diferencia en la frecuencia de resonancia medida.

Como se ha mencionado en el apartado 5.4, el protocolo de limpieza de las superficies utilizado en los experimentos llevados a cabo en capítulos anteriores, a pesar de servir para generar SAMs que mostraban respuestas estáticas reproducibles, no ha podido ser utilizado para formar SAMs que den respuestas dinámicas reproducibles. El conocimiento

adquirido acerca de la formación de las capas con la caracterización dinámica refuerza la hipótesis de que gran parte de la variabilidad observada y comentada en los resultados de los capítulos previos se debe a diferencias en la densidad superficial de DNA, no observables mediante el estudio de la respuesta estática. La medida de ambos modos permite, por tanto, un mayor control de las superficies a estudiar y a ensayar para la detección de secuencias relevantes.

Capítulo 6

Detección de *Klebsiella pneumoniae* y su resistencia a carbapenem a través de la medida de la frecuencia de resonancia

6.1 Introducción

Las enterobacterias se encuentran entre los microorganismos comensales más abundantes presentes en el cuerpo humano y son la causa más frecuente de infección bacteriana en pacientes de todas las edades.²⁰⁶ Desde los años 50, cuando empezaron a utilizarse antibióticos de amplio espectro, estas bacterias han ido adquiriendo cada vez más mecanismos para evadirlos. Los carbapenems son antibióticos betalactámicos y se utilizan como último recurso para tratar infecciones debidas a bacterias multirresistentes. La resistencia a carbapenems se ha expandido rápida y globalmente en la última década, lo que la ha convertido en un asunto de salud pública internacional y uno de los problemas a tratar más urgentes dentro de la lucha contra la resistencia a

antibióticos.²⁰⁷⁻²⁰⁹ La resistencia a carbapenems puede originarse por diferentes mecanismos, como alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa mediada por la pérdida de porinas, sobreexpresión de sistemas de expulsión de fármacos o la expresión de enzimas que hidrolizan los carbapenems, llamadas carbapenemasas, siendo esta última la causa más importante de la resistencia.²¹⁰ Las bacterias productoras de estas enzimas afectan principalmente a pacientes hospitalizados y suelen ser resistentes a todos los betalactámicos y la mayor parte del resto de antibióticos actuales, quedando muy pocas opciones terapéuticas para tratar a estos pacientes.²¹¹ Existen varios tipos de carbapenemasas, de los cuales A, B y D son los principales. La clase D incluye las carbapenemasas tipo OXA-48, descritas en *Klebsiella pneumoniae* (KP) y *Escherichia coli*.²⁰⁸ Estas carbapenemasas están codificadas por el gen *bla_{oxa48}*, que suele transmitirse en un plásmido de ~63 kb.²¹²

La detección de la producción de carbapenemasas se realiza normalmente mediante una selección inicial de cepas sospechosas de resistencia en la que se evalúa el crecimiento bacteriano en presencia de carbapenems, seguido de un ensayo fenotípico de confirmación para detectar la carbapenemasa específica. La detección de OXA-48 es problemática en la mayor parte de laboratorios clínicos²¹³ debido a que este enzima no hidroliza eficientemente los carbapenems y suelen dar como resultado falsos negativos. Existen diferentes tipos de ensayos fenotípicos: (i) Ensayos de sinergia, en los que se enfrenta la bacteria al carbapenem y a un inhibidor de carbapenemasas. La sensibilidad ronda el 78-80% y los ensayos comerciales disponibles actualmente son incapaces de detectar OXA-48.^{213,214} (ii) El ensayo de Hodge modificado, en el que se cultiva una cepa sensible junto a una resistente

en presencia de carbapenem. A pesar de ser un ensayo recomendado por el Instituto de Patrones Clínicos y de Laboratorio (CSLI) en EEUU,²¹⁵ se requieren 16 – 18 h para obtener los resultados y son difíciles de interpretar.^{216,217} (iii) Método de inactivación de carbapenems, desarrollado en 2015.²¹⁸ El carbapenem se incuba con la cepa sospechosa y, posteriormente, con una cepa sensible. Presenta buena sensibilidad (98.8%) y especificidad (100 %) pero los resultados se obtienen al cabo de 12-18 h. (iv) Carba-NP test,²¹⁹ basado en la medida del cambio de pH debido a la hidrólisis del carbapenem. Presenta la ventaja de ser rápido, pero se han demostrado sensibilidades del 21% para OXA-48.²²⁰ A pesar de presentar los inconvenientes mencionados, los métodos fenotípicos son los más utilizados debido a su bajo coste.⁷ Los métodos moleculares son los más fiables, siendo la PCR el ensayo de referencia.^{217,221,222} Si bien es cierto que la PCR presenta excelentes sensibilidad y especificidad, sigue presentando algunas limitaciones, como la susceptibilidad a la contaminación, la inhibición de la reacción por moléculas presentes en las muestras (hemoglobina, heparina, IgG, lactoferrina o mioglobina, entre otros) que afectan a la polimerasa o a los ácidos nucleicos y empeoran la eficiencia y el límite de detección,^{223,224} el elevado coste y que se requieren de 2 – 6 h para obtener los resultados.^{213,225} La PCR en tiempo real (RT-PCR) permite obtener los resultados más rápidamente, pero su coste es más elevado.²²⁶

Para competir con los métodos fenotípicos es necesario desarrollar técnicas de detección asequibles que presenten elevada sensibilidad y especificidad, especialmente con los productores de OXA-48, y con un tiempo de obtención de los resultados que permitan un diagnóstico temprano. Dispositivos tipo POC serían candidatos ideales para ofrecer una respuesta rápida, fiable y barata.

En este capítulo se demuestra la detección de la resistencia a carbapenem debido a la presencia del plásmido que contiene el gen *bla_{oxa48}* a través de la medida del cambio de frecuencia de resonancia fundamental de las palancas con muestras de lisados bacterianos. El objetivo consiste en y simplificar al máximo los pasos previos de preparación de la muestra para reducir costes, manejo y tiempo de ensayo. Asimismo, se demuestra la superioridad de este método respecto al método presentado en los Capítulos 3 y 4, basado en la medida de la tensión superficial inducida por la hidratación de las capas de DNA, para detectar el gen *bla_{oxa48}* en muestras de lisado.

6.2 Detección del gen *bla_{oxa48}* mediante el análisis de la tensión superficial inducida por la hidratación de las capas de DNA

Dado el buen resultado obtenido con el análisis de la tensión superficial inducida por la hidratación de las capas de DNA en la detección de muestras genómicas de *M. tuberculosis*, se ha tratado de detectar la resistencia a carbapenem de KP mediante este método. Se han utilizado muestras de DNA plasmídico purificado y muestras de lisados bacterianos. Cuanto menor sea la preparación de las muestras previa al ensayo con el sensor nanomecánico, mayor es el potencial para desarrollar un dispositivo tipo POC, por lo que es especialmente importante avanzar en la detección de secuencias con muestras procedentes directamente de colonias cultivadas o pacientes. Para este trabajo se ha podido disponer de lisados de *K. pneumoniae* obtenidos de cultivos derivados de muestras de pacientes del Hospital La Paz (Madrid).

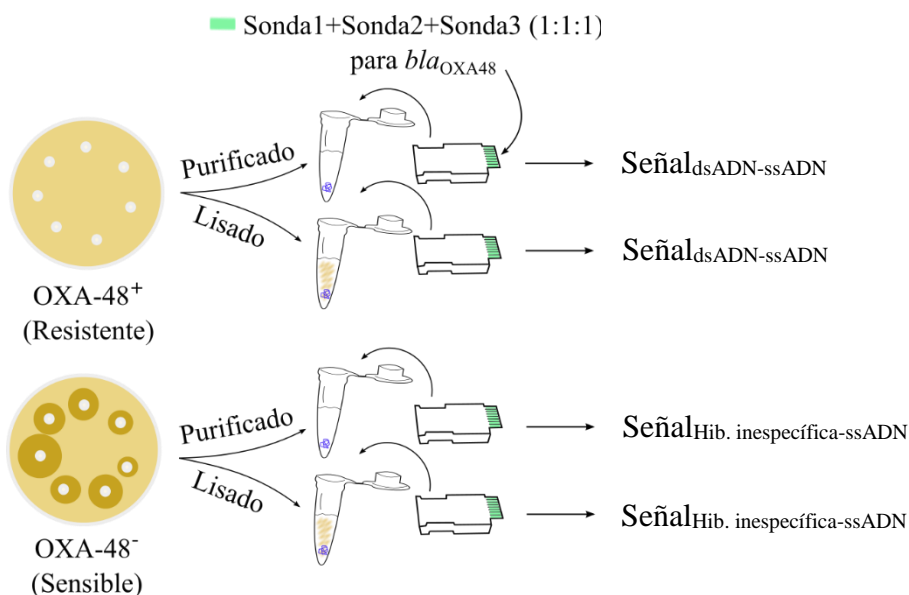


Figura 6.1 | Esquemización de los experimentos de detección del gen *bla*_{OXA48}, responsable de la resistencia a carbapenem en KP. Se han utilizado muestras de DNA plasmídico purificado y lisados bacterianos procedentes de aislados resistentes (OXA-48⁺) y sensibles (OXA-48⁻).

La detección del plásmido de KP responsable de la producción de la carbapenemasa OXA-48 se ha abordado a través de la medida de la respuesta mecánica de palancas funcionalizadas con sondas complementarias a regiones presentes en el gen *bla*_{OXA48}, antes y después de ser incubadas con muestras procedentes de aislados determinados en el hospital como resistentes (OXA-48⁺) o sensibles (OXA-48⁻). Se han utilizado dos tipos de muestras (Figura 6.1): uno de ellos contenía DNA plasmídico extraído y purificado; y el otro lisados bacterianos, en los que el DNA se encuentra inmerso en restos bacterianos. Este tipo de muestra supone un enorme reto para un nanosensor y este trabajo es el primero en abordarlo mediante un sensor nanomecánico. Las muestras han sido

proporcionadas por el grupo del Dr. Jesús Mingorance, del departamento de Microbiología del Hospital La Paz (Madrid).

Las muestras de KP clínicas suelen proceder de especímenes cultivados. El cultivo de KP es rápido (el tiempo de generación es de 13 min aproximadamente en medio rico),²²⁷ eficiente y de bajo coste (a diferencia de la citada MTB, capítulo 4). Por ello, se ha fijado la concentración de DNA bacteriano total en 200 ng/mL para los experimentos de detección y no se ha evaluado el límite de detección de la técnica, ya que con este microorganismo la obtención de muestras a la concentración citada tras un tiempo corto de cultivo no es limitante, como sí lo es en el caso de MTB. El objetivo prioritario en este trabajo es reducir el tiempo de análisis consiguiendo la detección de una muestra que permita simplificar al máximo su preparación de la muestra, siendo el objetivo más ambicioso el conseguir prescindir de la purificación previa del DNA.

<i>Nombre</i>	<i>Tipo</i>	<i>Secuencia de DNA</i>
<i>OXA48_s1</i>	Sonda	5'-ACATAAATCACAGGGCGTAGTTGTGCTCTG TTTTT-C ₃ H ₆ -SH-3'
<i>OXA48_s2</i>	Sonda	5'-AGGACATTTCTGGGCAATGTAGACAGTTTCT TTTTT-C ₃ H ₆ -SH-3'
<i>OXA48_s3</i>	Sonda	5'-GATGAATATGGATATGCCCACATCGGATGG TTTTT-C ₃ H ₆ -SH-3'

Tabla 6.1 | Secuencias de DNA utilizadas en este capítulo

Con el objetivo de aumentar la sensibilidad y especificidad, se ha inmovilizado en cada palanca una mezcla 1:1:1 de tres sondas diferentes complementarias a tres regiones del gen *bla_{oxa48}*. Las muestras de KP se han digerido con un enzima de restricción, *FastDigest* Hin6I (Thermo

Fisher), para facilitar la hibridación de las secuencias. Este enzima divide al gen en tres fragmentos, cada uno de ellos complementario a una de las sondas. Las sondas se han inmovilizado sobre palancas adquiridas del proveedor Micromotive durante un tiempo de 2h 15 min. Las palancas preparadas con las sondas de ssDNA pueden almacenarse a 4°C, de manera que estén listas para el ensayo de detección. Esto es importante de cara a una posible aplicación clínica, ya que reduce el tiempo total de uso al tiempo requerido para la incubación con la muestra problema, lavado y medida. La Tabla 6.1 muestra las secuencias de DNA utilizadas en el presente capítulo como sondas para la detección del gen *bla_{oxa48}*.

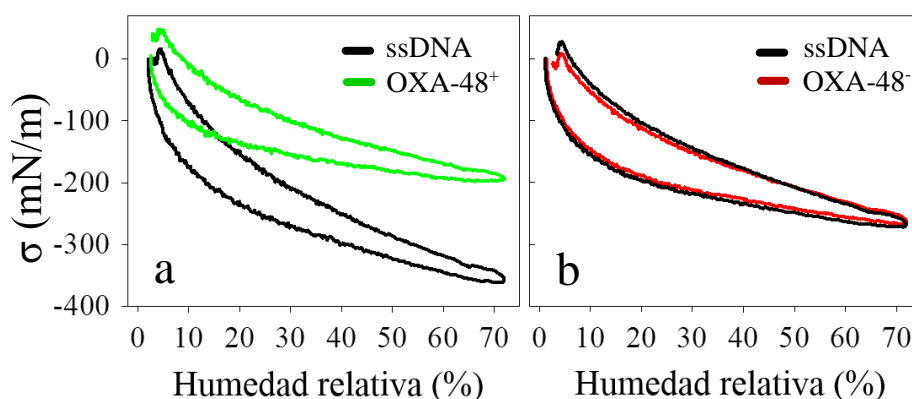


Figura 6.2 | Respuesta estática de palancas incubadas con muestras de KP OXA-48⁺ y OXA-48⁻. Curvas representativas obtenidas para las palancas funcionalizadas con la mezcla de las tres sondas (línea negra), y palancas incubadas **a)** con muestras de DNA purificado de asilados OXA-48⁺ (línea verde) y **b)** con muestras de DNA purificado de asilados OXA-48⁻ (línea roja).

Según el método desarrollado en los Capítulos 3 y 4, basado en la medida de la tensión superficial inducida por la hidratación, se midió la tensión superficial en función de la humedad relativa de cada palanca funcionalizada. Después las palancas se incubaron con muestras de KP

OXA-48⁺ y OXA-48⁻ durante 45 minutos a una concentración final de DNA total de 200 ng/mL; se lavaron y se midió de nuevo la tensión superficial. La Figura 6.2 muestra las curvas representativas de tensión superficial en función de la hidratación de las palancas funcionalizadas con las sondas (líneas negras), y de las mismas palancas tras su incubación con una muestra de DNA plasmídico purificado de un aislado OXA-48⁺ (línea verde, a)) y OXA-48⁻ (línea roja, b)).

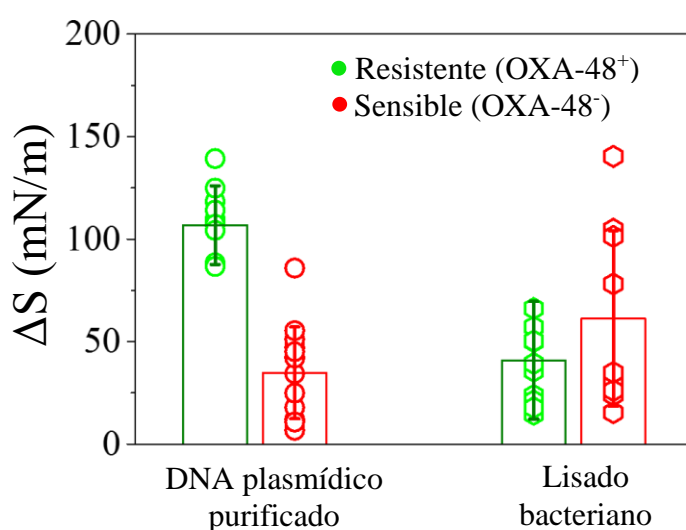


Figura 6.3 | Detección del plásmido que contiene el gen *bla*_{OXA-48} mediante la medida de la tensión superficial. Los datos representados en verde corresponden a las palancas incubadas con muestras procedentes de aislados resistentes (OXA-48⁺). Los datos representados en rojo corresponden a las palancas incubadas con muestras procedentes de aislados sensibles (OXA-48⁻). Se muestran todos los valores, la media y la desviación estándar de las señales ΔS obtenidas el ensayo de detección con muestras de DNA plasmídico purificado (círculos, izq.) y con muestras de lisado bacteriano (hexágonos, dcha.).

La señal del sensor utilizada para el análisis de la detección es la misma que se ha definido en el Capítulo 3 y se ha utilizado para la detección de MTB en el Capítulo 4, $\Delta S = |\sigma_{30\%,ssDNA} - \sigma_{30\%,dsDNA}|$. En la figura 6.3 se muestra la señal del sensor en modo estático obtenida para 10 y 14 palancas incubadas con muestras de DNA plasmídico purificado positivas (círculos verdes) y negativas (círculos rojos), respectivamente; y para 15 y 11 palancas incubadas con muestras de lisado bacteriano de KP positivas (hexágonos verdes) y negativas (hexágonos rojos), respectivamente.

Como en los Capítulos 3 y 4, se ha definido un valor umbral de detección calculado como el valor medio de las señales correspondientes a las muestras negativas en cada condición más dos veces su desviación estándar. Obtenemos para la detección del plásmido purificado 1 falso negativo de 10 y 1 falso positivo de 14, lo que se traduce en una tasa de verdaderos positivos de 0,90 y una tasa de verdaderos negativos de 0,93. Sin embargo, en el ensayo de detección llevado a cabo con las muestras de lisado bacteriano, dada la gran variabilidad obtenida con las muestras OXA-48^r, hemos obtenido 15 falsos negativos de 15, lo que se traduce en una tasa de verdaderos positivos de 0; y 0 falsos positivos de 11, es decir, una tasa de verdaderos negativos de 1. Por lo tanto, a pesar de que el método desarrollado basado en la medida de la tensión superficial ha dado buenos resultados en la detección del plásmido purificado, no tiene la capacidad de discriminar el gen *bla_{oxa48}* en una muestra de lisado, que contiene DNA genómico, plasmídico y restos bacterianos.

6.3 Propiedades mecánicas de las SAMs de DNA incubadas con el gen *bla_{oxa48}*

En el Capítulo 5 se ha demostrado la capacidad de discriminación de la hibridación de oligonucleótidos de DNA a través de la medida del cambio de frecuencia de resonancia fundamental de las palancas inducido por la hidratación. Una vez demostrado que el método basado en la medida de la tensión superficial no se puede utilizar para detectar el gen *bla_{oxa48}* directamente en un lisado de KP, se ha evaluado la detección del mismo mediante el método basado en la medida de la frecuencia de resonancia desarrollado en el Capítulo 5. Se han analizado las mismas palancas utilizadas para la medida de la tensión superficial, cuyos resultados se han mostrado en el apartado 6.2.

De forma simultánea a la tensión superficial, se midió la frecuencia de resonancia del primer modo en función de los ciclos de hidratación y deshidratación con cada palanca funcionalizada (ssDNA). Después, como se ha mencionado, las palancas se incubaron con muestras de KP OXA-48⁺ y OXA-48⁻ durante 45 minutos a una concentración final de DNA total de 200 ng/mL, se lavaron y se midió la frecuencia de resonancia de nuevo.

La figura 6.4 muestra las curvas representativas obtenidas para palancas funcionalizadas con la mezcla de sondas (línea negra) y para las mismas palancas incubadas con muestras de DNA plasmídico purificado OXA-48⁺ (línea verde) y OXA-48⁻ (línea roja). Las áreas sombreadas representan la desviación estándar obtenida para 8 palancas de una matriz. Las curvas están referenciadas al estado seco.

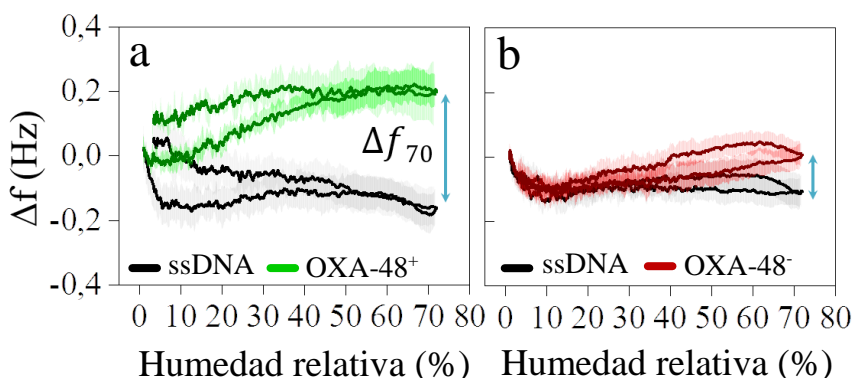


Figura 6.4 | Respuesta dinámica de palancas incubadas con muestras de KP OXA-48⁺ y OXA-48⁻. Curvas representativas obtenidas para las palancas funcionalizadas con la mezcla de las tres sondas (línea negra), y palancas incubadas **a)** con muestras de DNA purificado de asilados OXA-48⁺ (línea verde) y **b)** con muestras de DNA purificado de asilados OXA-48⁻ (línea roja). Las áreas sombreadas representan la desviación estándar obtenida para 8 palancas de una matriz.

Recordemos que el cambio de frecuencia puede ser debido a un cambio en la masa o en la rigidez efectiva de la palanca, mediado a su vez por un cambio en las propiedades elásticas o en el espesor de la capa de DNA. La densidad superficial a la que se han inmovilizado las sondas de ssDNA sobre las palancas en este trabajo se ha medido por XPS, como se ha explicado en el Capítulo 5, y se encuentra entre $1.4 - 7.2 \times 10^{12}$ moléculas/cm². Como podemos ver en la Figura 6.4, a estas densidades de inmovilización, las palancas funcionalizadas con las sondas (ssDNA, líneas negras) muestran un cambio de frecuencia negativo con la hidratación debido al aumento de masa dado por el agua que se adsorbe a la capa. Observamos que la frecuencia disminuye ~180 mHz para las palancas mostradas en a), y ~100 mHz para las palancas mostradas en b) al 70% de HR.

Tras la hibridación con los fragmentos del gen *bla_{oxa48}*, Figura 6.4 a), las palancas muestran un cambio de frecuencia de resonancia positivo con la hidratación. La frecuencia de las palancas incubadas con muestras de aislados OXA-48⁺ aumenta ~200 mHz en estado de plena hidratación, dando una diferencia entre el ssDNA y el dsDNA al 70% de HR de ~380 mHz.

En el Capítulo 5 hemos explicado los efectos de la hibridación de los oligonucleótidos diana con la monocapa de oligonucleótidos sonda sobre las propiedades mecánicas del sistema palanca-capas de DNA. La hibridación apantalla las interacciones intermoleculares atractivas que se dan entre hebras sencillas. Además, la cantidad de moléculas de agua que puede acomodarse entre las moléculas de DNA es menor debido a impedimentos estéricos. Como consecuencia, el módulo de Young de las capas de dsDNA disminuye un orden de magnitud respecto al de las capas de ssDNA. A densidades $< 5 \times 10^{13}$ moléculas/cm² la diferencia en el espesor generada por la hibridación de las capas provoca un aumento de la frecuencia de resonancia de las palancas con dsDNA respecto de las palancas con ssDNA.

En este capítulo la capa de moléculas de DNA sonda hibrida con moléculas que tienen una longitud comprendida entre 200 – 300 bases. Teniendo en cuenta que de estas moléculas sólo hibrida un fragmento de 30 bases, cabe esperar que las bases restantes se queden por encima de la capa de fragmentos hibridados (ver Figura 6.5) e interactúen entre sí como se ha descrito para las moléculas de ssDNA de una SAM en el Capítulo 5. La hidratación de estas capas provoca una disminución de la longitud de persistencia de estos grandes fragmentos de cadena sencilla, lo que favorece el aumento de las interacciones inter e intramoleculares

y, con ello el aumento tanto del módulo de Young y como del espesor de la capa, lo que se traduce en un aumento de la rigidez efectiva de la palanca.



Figura 6.5 | Representación esquemática de una palanca funcionalizada con las sondas utilizadas en este estudio tras la hibridación con las secuencias complementarias pertenecientes al gen *bla_{oxa48}*.

Por tanto, el cambio de frecuencia de ~ 380 mHz al 70% de HR mostrado por las palancas hibridadas en la Figura 6.4, respecto a las palancas sin hibridar, sugiere una dominancia del efecto de rigidez efectiva debido al aumento del espesor y del módulo de Young de la capa al hibridar provocado principalmente por los fragmentos de cadena sencilla de los fragmentos diana del gen *bla_{oxa48}*.

Este diferente comportamiento mecánico de las capas nos permite discriminar la presencia de hebras complementarias en la muestra, por lo que se ha definido la señal del sensor como el Δf entre la palanca con ssDNA y la palanca incubada con las muestras de KP al 70% de HR, $\Delta f_{70} = \Delta f_{dsDNA,70\%HR} - \Delta f_{ssDNA,70\%HR}$ (ver Figura 6.4 a)). En el caso de las palancas incubadas con muestras de aislados OXA-48⁻, Figura 6.4 b), la diferencia de frecuencia a máxima hidratación es de ~ 100 mHz, ya que la frecuencia al 70% de HR de las palancas tras la incubación es ~ 0

Hz. Esta señal es atribuible principalmente a hibridación o adsorción inespecíficas y está dentro del error de medida.

6.4 Detección del gen *bla*_{OXA-48} mediante el análisis del cambio de frecuencia inducido por la hidratación de las capas de DNA

Una vez definida la señal del sensor actuando en modo dinámico, pasamos a analizar las señales obtenidas con las mismas palancas que se han utilizado para las medidas de tensión superficial en el apartado 6.2.

En la figura 6.6 se muestra la señal del sensor en modo dinámico (Δf_{70}) obtenida para 10 y 14 palancas incubadas con muestras de DNA plasmídico purificado positivas (círculos verdes) y negativas (círculos rojos), respectivamente; y para 15 y 11 palancas incubadas con muestras de lisado bacteriano de KP positivas (hexágonos verdes) y negativas (hexágonos rojos), respectivamente.

Como anteriormente, se ha definido un valor umbral de detección calculado como el valor medio de las señales correspondientes a las muestras negativas en cada condición más dos veces su desviación estándar. Hemos obtenido para la detección del plásmido purificado 0 falsos negativos de 10 y 0 falsos positivos de 14, lo que se traduce en una tasa de verdaderos positivos de 1 y una tasa de verdaderos negativos de 1, en este pequeño ensayo. En el ensayo de detección realizado con los lisados bacterianos hemos obtenido 4 falsos negativos de 15 y 0 falsos positivos de 11, es decir, una tasa de verdaderos positivos de 0,73 y una tasa de verdaderos negativos de 1.

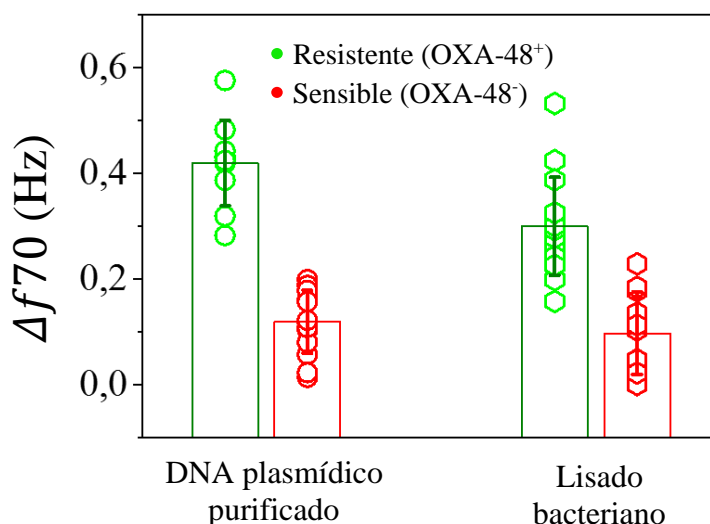


Figura 6.6 | Detección del plásmido que contiene el gen *bla*_{OXA-48} mediante la medida de la frecuencia de resonancia. Los datos representados en verde corresponden a las palancas incubadas con muestras procedentes de aislados resistentes (OXA-48⁺). Los datos representados en rojo corresponden a las palancas incubadas con muestras procedentes de aislados sensibles (OXA-48⁻). Se muestran todos los valores, la media y la desviación estándar del ensayo de detección con muestras de DNA plasmídico purificado (círculos, izq.) y con muestras de lisado bacteriano (hexágonos, dcha.).

La medida *ex situ* de la variación tanto de tensión superficial como de rigidez tras la hibridación de las capas de DNA permite la correcta discriminación del gen *bla*_{OXA-48} en muestras de plásmidos purificados. El gen *bla*_{OXA-48} ha sido detectado en presencia de DNA no relacionado en un tiempo total de 1h 30 min, lo que resulta muy ventajoso frente a los métodos fenotípicos tradicionales, con los que se pueden llegar a requerir tiempos de 16 - 18 h para obtener los resultados.

Mientras que la medida de la tensión superficial no ha permitido la discriminación del gen en muestras de lisado con restos bacterianos, el análisis de la frecuencia de resonancia en función de la hidratación sí ha posibilitado su detección, dando como resultado una tasa de verdaderos positivos de 0,73 y de verdaderos negativos de 1.

Es probable que en este caso el DNA no esté alcanzando correctamente la SAM formada por la sonda, bien sea por una digestión enzimática ineficiente o por la presencia de obstáculos moleculares, por lo que es posible que la hibridación no se de en un amplio porcentaje de moléculas. La generación de tensión superficial, o de un cambio de tensión, requiere que las regiones en las que se produce el reconocimiento molecular estén conectadas entre sí para su correcta transmisión a lo largo de la palanca y la inducción de la deflexión.⁵⁴ Aunque el porcentaje de hebras hibridadas no sea elevado, si las sondas se encuentran en una situación de hacinamiento molecular la tensión puede ser transmitida eficientemente (Capítulo 4). Sin embargo, en este capítulo las sondas han sido inmovilizadas a un tiempo corto (2 h 15 min) y las densidades superficiales de las capas formadas son $< 10^{13}$ moléculas/cm², que por otro lado es la situación más accesible tecnológicamente. Por tanto, el menor hacinamiento molecular puede ser el responsable de que la tensión inducida por la hidratación de las pocas moléculas hibridadas no se haya transmitido de forma eficiente como para generar un cambio de tensión superficial medible con respecto al ssDNA.

Sin embargo, la hibridación ha resultado suficiente para la detección a través de la medida de la frecuencia de resonancia. En este caso, los cambios en rigidez, debidos probablemente a los fragmentos de

cadena sencilla de las moléculas que hibridan y que quedan por encima de la capa de oligonucleótidos, contribuyen a la señal del biosensor.

Aun así, la detección del gen *bla*_{OXA-48} en muestras de lisado bacteriano mediante la medida de la frecuencia de resonancia debe ser mejorada, ya que se ha obtenido una tasa de verdaderos positivos de 0,73 con las condiciones de hibridación establecidas en este trabajo. Para descartar que la digestión enzimática haya sido ineficiente o que la presencia de obstáculos moleculares haya impedido a las secuencias diana acceder a la capa de sondas de manera eficiente, podría considerarse alargar el tiempo de digestión enzimática previa a la hibridación o el uso de moléculas que favorecen el hacinamiento molecular en solución (polietilenglicol, ficoll®, polivinilpirrolidona, etc.), para incrementar la concentración local de las secuencias de DNA. La hibridación se ha llevado a cabo a una temperatura de 30 °C, debido a que fue la temperatura a la que se optimizó la detección de las secuencias de MTB, mostrada en el Capítulo 4. Sería deseable optimizar la temperatura de hibridación para las secuencias estudiadas en este capítulo. También podría evaluarse una reducción de la astringencia de la hibridación aumentando la concentración de Na⁺.

Actualmente se están desarrollando nuevos métodos de detección de carbapenemasas basados en espectrometría de masas (MALDI-TOF),^{228,229} electroquímica²³⁰ o inmunocromatografía.²³¹ Sin embargo, todavía ninguno se ha establecido como una alternativa a los métodos más utilizados (fenotípicos y PCR).²¹³

En este capítulo se demuestra la capacidad de las palancas actuando en modo dinámico para detectar la presencia del gen responsable de la producción de la carbapenemasa OXA-48. Dado que

se trata de un ensayo basado en el análisis genético molecular, comparte con la técnica molecular más establecida, la PCR, el inconveniente de no poder ser utilizado para el descubrimiento de nuevos genes relacionados con la resistencia. Sin embargo, dado su elevado potencial para la implementación en un sistema de detección múltiple simultánea y la miniaturización, abre la puerta al futuro desarrollo de un ensayo de diagnóstico en el punto de atención al paciente (POC).

6.5 Conclusiones

Esta es la primera vez que un dispositivo nanomecánico es utilizado para detectar el gen responsable de la producción de la carbapenemasa OXA-48, *bla_{OXA48}*, en una muestra de lisado bacteriano sin purificar.

Se demuestra como prueba de concepto que diferencias en las propiedades mecánicas generadas por diferencias en las interacciones intermoleculares debidas a la hibridación, lo que se traduce en un cambio de frecuencia de resonancia medible, pueden ser utilizadas para discriminar la presencia de fragmentos de DNA largos (200 – 300 pb).

La capacidad de definir el estado de capa de ssDNA de la que partimos para hacer los experimentos de hibridación y el hecho de que se maximice la señal del sensor con las muestras positivas a densidades de ssDNA intermedias, más accesibles experimentalmente, facilita su implementación con superficies de oro comerciales o reutilizadas con las que no podrían obtenerse capas muy compactadas y extendidas.

La técnica presenta la sensibilidad y especificidad suficiente para discriminar la presencia del plásmido responsable de la producción de la carbapenemasa OXA-48 en muestras que contienen el plásmido y DNA no relacionado en exceso. Sin embargo, es necesario mejorar la discriminación en las muestras de lisado bacteriano.

El tiempo necesario total para llevar a cabo la detección es de 1 h 30 min. El aumento de la sensibilidad con las muestras de lisado podría en un futuro dar lugar al desarrollo de un test de diagnóstico con un tiempo de obtención de resultado menor a 2 h sin necesidad de amplificación previa ni marcaje molecular.

Conclusiones

El estudio de la variación de las propiedades mecánicas de las capas de DNA ancladas a micropalancas en función de distintas variables, como la hidratación, la densidad superficial o las condiciones de hibridación (tiempo y concentración de secuencia diana) ha permitido:

- Por una parte, profundizar en la comprensión de los mecanismos que generan estos cambios en las propiedades mecánicas y que, por tanto, influyen en la respuesta estática o dinámica del sensor.
- Por otra parte, optimizar los protocolos para la detección tanto de oligonucleótidos sintéticos, como de secuencias de DNA de cientos de bases de origen celular.

Se ha demostrado, por primera vez y como prueba de concepto, la detección mediante un sensor nanomecánico de fragmentos de DNA en muestras de lisado celular. Concretamente, se ha detectado el gen que codifica la carbapenemasa OXA-48 en lisados de aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*. Se han obtenido una sensibilidad de 0.73 y una especificidad de 1.

Además, se ha demostrado la detección nanomecánica *ex situ* de fragmentos de DNA genómico procedentes del patógeno *Mycobacterium tuberculosis* a partir de muestras purificadas indicativos de la presencia de la bacteria con una sensibilidad de 1, especificidad de 0.97 y límite de

detección de 20 pg/mL; y de su resistencia a rifampicina debida a un único desapareamiento, con una sensibilidad de 0.84, especificidad de 1 y límite de detección de 20 pg/mL.

Asimismo, se ha demostrado la detección de fragmentos de DNA plasmídico con una sensibilidad de 1 y especificidad de 1 a partir de muestras purificadas procedentes de *Klebsiella pneumoniae*, indicativos de la producción de la carbapenemasa OXA-48, que confiere resistencia a carbapenem.

Apéndice

Calibración del sistema experimental utilizando el ruido termomecánico de la palanca

Cada palanca vibra de forma natural, por el hecho de estar a una temperatura $\neq 0^\circ \text{K}$, a determinadas frecuencias, llamadas frecuencias de resonancia, con mayor amplitud que a otras. Esta amplitud de vibración depende de la constante elástica de la palanca, k .

Cuando medimos la deformación de una palanca mediante un sistema de lectura óptico, la información que se recibe desde el PSD es un cambio en el voltaje medido debido a que el haz láser se mueve en la superficie del fotodetector de forma síncrona. El sistema se calibra según la diferencia de potencial que se corresponde con la amplitud de vibración térmica de la palanca.

Una vez conocemos la relación entre el voltaje medido y la deflexión generada, podemos calcular la tensión superficial que induce esta deformación, puesto que son directamente proporcionales.

La calibración se lleva a cabo siguiendo tres pasos:

1. Calibración de la constante elástica, k , de las palancas mediante el método descrito por John E. Sader.^{86,232}

En primer lugar, se mide el espectro de ruido térmico de la palanca a partir de la salida en voltaje del PSD. La frecuencia del modo fundamental se ajusta a la función de transferencia $S(f)$ de un oscilador armónico simple:

$$S(f) = P_{blanco} + \frac{P_{dc} f_R^4}{(f^2 - f_R^2)^2 + \frac{f f_R^2}{Q^2}} \quad (A.1)$$

donde f es la frecuencia, f_R la frecuencia de resonancia, Q es el factor de calidad, P_{dc} es la respuesta (V^2/Hz) de la palanca obtenida a través del PSD, y P_{blanco} es el ruido blanco (V^2/Hz). El ruido blanco es aquel cuya amplitud no depende de la frecuencia. A continuación, se realiza un ajuste de mínimos cuadrados para determinar la frecuencia de resonancia f_R y el factor de calidad Q . Por último, se obtiene la constante elástica k por el método de Sader.^{86,232}

2. Evaluación de la constante de calibración del PSD conocida en la literatura como constante *InvOLS*.⁸⁷ Esta constante se define como la relación entre el desplazamiento real de la palanca, es decir, la amplitud de la vibración, y el voltaje medido por el PSD, S_V .

$$InvOLS = \frac{z}{S_v} \quad (A.2)$$

El teorema de equipartición, que relaciona la temperatura de un sistema con su energía media por grado de libertad del sistema, aplicado al modo fundamental establece que:

$$\frac{1}{2} k_B T = \frac{1}{2} k \langle z_{max}^2 \rangle \quad (A.3)$$

donde k es la constante elástica de la palanca, $\langle z_{max}^2 \rangle$ es la media cuadrática de las amplitudes de fluctuación de la palanca, k_B es la constante de Boltzmann, y T es la temperatura absoluta. Integrando el segundo término a la derecha de la ecuación (A.3) sobre todas las frecuencias, e incorporando la definición de *InvOLS* obtenemos:

$$\langle z_{max}^2 \rangle = \frac{\pi}{2} InvOLS^2 \nu_R P_{DC} Q \quad (A.4)$$

Y sustituyendo la ecuación (A.4) en la (A.3) obtenemos:

$$InvOLS = \sqrt{\frac{2 k_B T}{\pi k \nu_R P_{dc} Q}} \quad (A.5)$$

Para calcular la constante *InvOLS* mediante la ecuación (A.5), se utiliza la constante elástica k , previamente determinada por el método de Sader.

Ahora se puede convertir cada diferencia de voltaje en la deflexión real de la palanca mediante:

$$Z_{palanca} = InvOLS \ Z_{volt} \quad (A.6)$$

donde Z_{volt} y $Z_{palanca}$ son la deflexión de la palanca expresada en *voltios* y *nm*, respectivamente.

3. Determinación de la constante que relaciona la deflexión de la palanca con la cantidad de tensión superficial producida por la capa biológica. Esta constante depende de la geometría y de las propiedades elásticas del material de la palanca.

La deflexión expresada en nm, $Z_{palanca}$, puede ser transformada en tensión superficial expresada en N/m, σ , aplicando la siguiente relación:

$$\sigma = \alpha \ Z_{palanca} \quad (A.7)$$

donde α viene determinada por:

$$\alpha = \frac{2t_s}{6L^2} \left(\frac{E_s(t_s - 2t_r)(1 - \nu_r) + 4E_r t_r(1 - \nu_s)}{(1 - \nu_r)(1 - \nu_s)} \right) \quad (A.8)$$

donde t es el espesor, L la longitud, E el módulo de Young y ν el coeficiente de Poisson. Los subíndices s y r se refieren al sustrato (Si en nuestro caso) y al recubrimiento (Au en nuestro caso) de la palanca, respectivamente.

Bibliografía

1. Rapley R, Harbron S. Molecular analysis and genome discovery: Wiley Online Library; 2004.
2. Debnath M, Prasad GB, Bisen PS. Molecular diagnostics: promises and possibilities: Springer Science & Business Media; 2010.
3. Zourob M, Elwary S, Turner AP. Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and microsystems: Springer Science & Business Media; 2008.
4. Kirsch J, Siltanen C, Zhou Q, Revzin A, Simonian A. Biosensor technology: recent advances in threat agent detection and medicine. *Chemical Society Reviews* 2013; **42**(22): 8733-68.
5. Reischl U, Schmitz RP. In Search of a New Gold Standard â A Technical Review of Molecular Approaches to Improve Early Diagnosis of Microbial-induced Sepsis. 2011.
6. Raviglione M, Sulis G. Tuberculosis 2015: burden, challenges and strategy for control and elimination. *Infectious Disease Reports* 2016; **8**(2).
7. Pulido MR, García-Quintanilla M, Martín-Peña R, Cisneros JM, McConnell MJ. Progress on the development of rapid methods for antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2013: dkt253.
8. McKendry R, Zhang J, Arntz Y, et al. Multiple label-free biodetection and quantitative DNA-binding assays on a nanomechanical cantilever array. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002; **99**(15): 9783-8.

9. Zhang J, Lang H, Huber F, et al. Rapid and label-free nanomechanical detection of biomarker transcripts in human RNA. *Nature nanotechnology* 2006; **1**(3): 214-20.
10. Huber F, Lang H, Backmann N, Rimoldi D, Gerber C. Direct detection of a BRAF mutation in total RNA from melanoma cells using cantilever arrays. *Nature nanotechnology* 2013; **8**(2): 125-9.
11. Mertens J, Rogero C, Calleja M, et al. Label-free detection of DNA hybridization based on hydration-induced tension in nucleic acid films. *Nature nanotechnology* 2008; **3**(5): 301-7.
12. Kosaka PM, Tamayo J, Calleja M. Advances and Challenges to Bring Nanomechanical Biosensors to Biochemistry Labs and Clinical Use. *Nanocantilever Beams: Modeling, Fabrication, and Applications* 2015: 431.
13. Huber F, Lang H, Gerber C. Nanomechanical sensors: Measuring a response in blood. *Nature nanotechnology* 2014; **9**(3): 165-7.
14. Shekhawat GS, Dravid VP. Nanomechanical sensors: Bent on detecting cancer. *Nature nanotechnology* 2013; **8**(2): 77-8.
15. Frueh FW. Impact of microarray data quality on genomic data submissions to the FDA. *Nature Biotechnology* 2006; **24**(9): 1105-7.
16. Casciano DA, Woodcock J. Empowering microarrays in the regulatory setting. *Nature biotechnology* 2006; **24**(9): 1103-.
17. Schmitt TJ, Rogers JB, Knotts IV TA. Exploring the mechanisms of DNA hybridization on a surface. *The Journal of chemical physics* 2013; **138**(3): 035102.
18. Watkins HM, Simon AJ, Ricci F, Plaxco KW. Effects of Crowding on the Stability of a Surface-Tethered Biopolymer: An Experimental Study of Folding in a Highly Crowded Regime. *Journal of the American Chemical Society* 2014; **136**(25): 8923-7.
19. Lei Q-l, Ren C-l, Su X-h, Ma Y-q. Crowding-induced cooperativity in DNA surface hybridization. *Scientific reports* 2015; **5**.

20. Knotts IV TA, Rathore N, Schwartz DC, de Pablo JJ. A coarse grain model for DNA. *The Journal of chemical physics* 2007; **126**(8): 084901.
21. Sambriski E, Schwartz D, De Pablo J. Uncovering pathways in DNA oligonucleotide hybridization via transition state analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009; **106**(43): 18125-30.
22. Sambriski E, Ortiz V, De Pablo J. Sequence effects in the melting and renaturation of short DNA oligonucleotides: structure and mechanistic pathways. *Journal of Physics: Condensed Matter* 2008; **21**(3): 034105.
23. Wong IY, Melosh NA. An electrostatic model for DNA surface hybridization. *Biophysical journal* 2010; **98**(12): 2954-63.
24. Wong K-Y, Pettitt BM. The pathway of oligomeric DNA melting investigated by molecular dynamics simulations. *Biophysical journal* 2008; **95**(12): 5618-26.
25. Clark LC, Lyons C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of sciences* 1962; **102**(1): 29-45.
26. Orellana G. Fluorescence-based sensors. *Optical Chemical Sensors*: Springer; 2006: 99-116.
27. Calleja M, Kosaka PM, San Paulo Á, Tamayo J. Challenges for nanomechanical sensors in biological detection. *Nanoscale* 2012; **4**(16): 4925-38.
28. Zeng S, Baillargeat D, Ho H-P, Yong K-T. Nanomaterials enhanced surface plasmon resonance for biological and chemical sensing applications. *Chemical Society Reviews* 2014; **43**(10): 3426-52.
29. Wang J. Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics* 2006; **21**(10): 1887-92.
30. Wang J. Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: A review. *Electroanalysis* 2005; **17**(1): 7-14.
31. Dixon MC. Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring: enabling real-time characterization of biological materials and their interactions. *Journal of biomolecular techniques: JBT* 2008; **19**(3): 151.

32. Lange K, Rapp BE, Rapp M. Surface acoustic wave biosensors: a review. *Analytical and bioanalytical chemistry* 2008; **391**(5): 1509-19.
33. Lavrik NV, Sepaniak MJ, Datskos PG. Cantilever transducers as a platform for chemical and biological sensors. *Review of scientific instruments* 2004; **75**(7): 2229-53.
34. Jensen K, Kim K, Zettl A. An atomic-resolution nanomechanical mass sensor. *Nature nanotechnology* 2008; **3**(9): 533-7.
35. Fritz J. Cantilever biosensors. *analyst* 2008; **133**(7): 855-63.
36. Tamayo J, Kosaka PM, Ruz JJ, San Paulo , Calleja M. Biosensors based on nanomechanical systems. *Chemical Society Reviews* 2013; **42**(3): 1287-311.
37. Arlett J, Myers E, Roukes M. Comparative advantages of mechanical biosensors. *Nature nanotechnology* 2011; **6**(4): 203-15.
38. Gas analyzer. Google Patents; 1943.
39. Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic force microscope. *Physical review letters* 1986; **56**(9): 930.
40. Thundat T, Warmack RJ, Chen G, Allison D. Thermal and ambient-induced deflections of scanning force microscope cantilevers. *Applied Physics Letters* 1994; **64**(21): 2894-6.
41. Barnes J, Stephenson R, Welland M, Gerber C, Gimzewski J. Photothermal spectroscopy with femtojoule sensitivity using a micromechanical device. *Nature* 1994; **372**(6501): 79-81.
42. Barnes J, Stephenson R, Woodburn C, et al. A femtojoule calorimeter using micromechanical sensors. *Review of Scientific Instruments* 1994; **65**(12): 3793-8.
43. Raiteri R, Butt H-J. Measuring electrochemically induced surface stress with an atomic force microscope. *The Journal of Physical Chemistry* 1995; **99**(43): 15728-32.
44. Berger R, Delamarche E, Lang HP, et al. Surface stress in the self-assembly of alkanethiols on gold. *Science* 1997; **276**(5321): 2021-4.

45. Buchapudi KR, Huang X, Yang X, Ji H-F, Thundat T. Microcantilever biosensors for chemicals and bioorganisms. *Analyst* 2011; **136**(8): 1539-56.
46. Ramos D, Mertens J, Calleja M, Tamayo J. Study of the origin of bending induced by bimetallic effect on microcantilever. *Sensors* 2007; **7**(9): 1757-65.
47. Rugar D, Budakian R, Mamin H, Chui B. Single spin detection by magnetic resonance force microscopy. *Nature* 2004; **430**(6997): 329-32.
48. Wu G, Ji H, Hansen K, et al. Origin of nanomechanical cantilever motion generated from biomolecular interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001; **98**(4): 1560-4.
49. Fritz J, Baller M, Lang H, et al. Translating biomolecular recognition into nanomechanics. *Science* 2000; **288**(5464): 316-8.
50. Huber F, Lang HP, Glatz K, Rimoldi D, Meyer E, Gerber C. Fast diagnostics of BRAF mutations in biopsies from malignant melanoma. *Nano Letters* 2016.
51. Yue M, Lin H, Dedrick DE, et al. A 2-D microcantilever array for multiplexed biomolecular analysis. *Journal of Microelectromechanical Systems* 2004; **13**(2): 290-9.
52. Gibbs JW. The scientific papers of J. Willard Gibbs: Longmans, Green and Company; 1906.
53. Godin M, Tabard-Cossa V, Miyahara Y, et al. Cantilever-based sensing: the origin of surface stress and optimization strategies. *Nanotechnology* 2010; **21**(7): 075501.
54. Sushko ML, Harding JH, Shluger AL, McKendry RA, Watari M. Physics of nanomechanical biosensing on cantilever arrays. *Advanced Materials* 2008; **20**(20): 3848-53.
55. Hagan MF, Majumdar A, Chakraborty AK. Nanomechanical forces generated by surface grafted DNA. *The Journal of Physical Chemistry B* 2002; **106**(39): 10163-73.

56. Mader A, Gruber K, Castelli R, et al. Discrimination of escherichia coli strains using glycan cantilever array sensors. *Nano letters* 2011; **12**(1): 420-3.
57. Waggoner PS, Craighead HG. Micro-and nanomechanical sensors for environmental, chemical, and biological detection. *Lab on a Chip* 2007; **7**(10): 1238-55.
58. Wu G, Datar RH, Hansen KM, Thundat T, Cote RJ, Majumdar A. Bioassay of prostate-specific antigen (PSA) using microcantilevers. *Nature biotechnology* 2001; **19**(9): 856-60.
59. Calleja M, Tamayo J, Nordström M, Boisen A. Low-noise polymeric nanomechanical biosensors. *Applied Physics Letters* 2006; **88**(11): 113901.
60. Arntz Y, Seelig JD, Lang H, et al. Label-free protein assay based on a nanomechanical cantilever array. *Nanotechnology* 2002; **14**(1): 86.
61. Bai X, Hou H, Zhang B, Tang J. Label-free detection of kanamycin using aptamer-based cantilever array sensor. *Biosensors and Bioelectronics* 2014; **56**: 112-6.
62. Masmanidis SC, Karabalin RB, De Vlaminck I, Borghs G, Freeman MR, Roukes ML. Multifunctional nanomechanical systems via tunably coupled piezoelectric actuation. *Science* 2007; **317**(5839): 780-3.
63. Kiracofe D, Kobayashi K, Labuda A, Raman A, Yamada H. High efficiency laser photothermal excitation of microcantilever vibrations in air and liquids. *Review of Scientific Instruments* 2011; **82**(1): 013702.
64. Ramos D, Tamayo J, Mertens J, Calleja M, Zaballos A. Origin of the response of nanomechanical resonators to bacteria adsorption. *Journal of Applied Physics* 2006; **100**(10): 106105.
65. Chaste J, Eichler A, Moser J, Ceballos G, Rurali R, Bachtold A. A nanomechanical mass sensor with yoctogram resolution. *Nature nanotechnology* 2012; **7**(5): 301-4.
66. Yang Y, Callegari C, Feng X, Ekinici K, Roukes M. Zeptogram-scale nanomechanical mass sensing. *Nano letters* 2006; **6**(4): 583-6.

67. Waggoner PS, Varshney M, Craighead HG. Detection of prostate specific antigen with nanomechanical resonators. *Lab on a Chip* 2009; **9**(21): 3095-9.
68. Kosaka PM, Pini V, Ruz J, et al. Detection of cancer biomarkers in serum using a hybrid mechanical and optoplasmonic nanosensor. *Nature nanotechnology* 2014; **9**(12): 1047-53.
69. Guan W, Cui Y, Zhao W, Gu C. Ultrasensitive Label-Free DNA Detection Using Cantilever of Atomic Force Microscope Amplified by Gold Nanoparticles. *Sensor Letters* 2016; **14**(1): 54-8.
70. Cleland A, Roukes M. Noise processes in nanomechanical resonators. *Journal of Applied Physics* 2002; **92**(5): 2758-69.
71. Schäffer T, Cleveland J, Ohnesorge F, Walters D, Hansma P. Studies of vibrating atomic force microscope cantilevers in liquid. *Journal of applied physics* 1996; **80**(7): 3622-7.
72. Xu X, Raman A. Comparative dynamics of magnetically, acoustically, and Brownian motion driven microcantilevers in liquids. *Journal of Applied Physics* 2007; **102**(3): 034303.
73. Ramos D, Tamayo J, Mertens J, Calleja M. Photothermal excitation of microcantilevers in liquids. *Journal of applied physics* 2006; **99**(12): 124904.
74. Han W, Lindsay S, Jing T. A magnetically driven oscillating probe microscope for operation in liquids. *Applied Physics Letters* 1996; **69**(26): 4111-3.
75. Thundat TG, Ferrell TL, Hansen KM, Tian F. High throughput microcantilever detector. Google Patents; 2004.
76. Lang H, Berger R, Andreoli C, et al. Sequential position readout from arrays of micromechanical cantilever sensors. *Applied Physics Letters* 1998; **72**(3): 383-5.
77. Boisen A, Thaysen J, Jensenius H, Hansen O. Environmental sensors based on micromachined cantilevers with integrated read-out. *Ultramicroscopy* 2000; **82**(1): 11-6.

78. Oden P, Datskos P, Thundat T, Warmack R. Uncooled thermal imaging using a piezoresistive microcantilever. *Applied Physics Letters* 1996; **69**(21): 3277-9.
79. Baxter LK. Capacitive sensors. *Ann Arbor* 2000; **1001**: 48109.
80. DeVoe DL, Pisano AP. Modeling and optimal design of piezoelectric cantilever microactuators. *Journal of Microelectromechanical systems* 1997; **6**(3): 266-70.
81. Lee JH, Yoon KH, Kim TS. Characterization of resonant behavior and sensitivity using micromachined PZT cantilever. *Integrated Ferroelectrics* 2002; **50**(1): 43-52.
82. Meyer G, Amer NM. Novel optical approach to atomic force microscopy. *Applied physics letters* 1988; **53**(12): 1045-7.
83. Rugar D, Mamin H, Guethner P. Improved fiber-optic interferometer for atomic force microscopy. *Applied Physics Letters* 1989; **55**(25): 2588-90.
84. Savran C, Burg T, Fritz J, Manalis S. Microfabricated mechanical biosensor with inherently differential readout. *Applied Physics Letters* 2003; **83**(8): 1659-61.
85. Álvarez M, Tamayo J. Optical sequential readout of microcantilever arrays for biological detection. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2005; **106**(2): 687-90.
86. Sader JE, Chon JW, Mulvaney P. Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers. *Review of Scientific Instruments* 1999; **70**(10): 3967-9.
87. Higgins M, Proksch R, Sader JE, et al. Noninvasive determination of optical lever sensitivity in atomic force microscopy. *Review of Scientific Instruments* 2006; **77**(1): 013701.
88. Martínez N, Kosaka PM, Tamayo J, et al. High throughput optical readout of dense arrays of nanomechanical systems for sensing applications. *Review of scientific instruments* 2010; **81**(12): 125109.

89. Vericat C, Vela M, Benitez G, Carro P, Salvarezza R. Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system. *Chemical Society Reviews* 2010; **39**(5): 1805-34.
90. Häkkinen H. The gold-sulfur interface at the nanoscale. *Nature chemistry* 2012; **4**(6): 443-55.
91. Love JC, Estroff LA, Kriebel JK, Nuzzo RG, Whitesides GM. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chemical reviews* 2005; **105**(4): 1103-70.
92. Murphy JN, Cheng AK, Yu H-Z, Bizzotto D. On the nature of DNA self-assembled monolayers on Au: measuring surface heterogeneity with electrochemical in situ fluorescence microscopy. *Journal of the American Chemical Society* 2009; **131**(11): 4042-50.
93. Bietsch A, Zhang J, Hegner M, Lang HP, Gerber C. Rapid functionalization of cantilever array sensors by inkjet printing. *Nanotechnology* 2004; **15**(8): 873.
94. Bosco FG, Hwu E-T, Chen C-H, et al. High throughput label-free platform for statistical bio-molecular sensing. *Lab on a Chip* 2011; **11**(14): 2411-6.
95. Thorsen T, Maerkl SJ, Quake SR. Microfluidic large-scale integration. *Science* 2002; **298**(5593): 580-4.
96. Biswal SL, Raorane D, Chaiken A, Birecki H, Majumdar A. Nanomechanical detection of DNA melting on microcantilever surfaces. *Analytical chemistry* 2006; **78**(20): 7104-9.
97. Israelachvili J, Wennerström H. Role of hydration and water structure in biological and colloidal interactions. 1996.
98. Rijal K, Mutharasan R. A method for DNA-based detection of E. coli O157: H7 in a proteinous background using piezoelectric-excited cantilever sensors. *Analyst* 2013; **138**(10): 2943-50.
99. Sharma H, Mutharasan R. hly A gene-based sensitive detection of listeria monocytogenes using a novel cantilever sensor. *Analytical chemistry* 2013; **85**(6): 3222-8.

100. Huang Y-J, Huang C-W, Lin T-H, et al. A CMOS cantilever-based label-free DNA SoC with improved sensitivity for hepatitis B virus detection. *IEEE transactions on biomedical circuits and systems* 2013; **7**(6): 820-31.
101. Xu T, Yu H, Xu P, et al. Real-time enzyme-digesting identification of double-strand DNA in a resonance-cantilever embedded micro-chamber. *Lab on a Chip* 2014; **14**(6): 1206-14.
102. Stachowiak JC, Yue M, Castelino K, Chakraborty A, Majumdar A. Chemomechanics of surface stresses induced by DNA hybridization. *Langmuir* 2006; **22**(1): 263-8.
103. Zhang J, Lang HP, Yoshikawa G, Gerber C. Optimization of DNA hybridization efficiency by pH-driven nanomechanical bending. *Langmuir* 2012; **28**(15): 6494-501.
104. Petrovykh DY, Kimura-Suda H, Whitman LJ, Tarlov MJ. Quantitative analysis and characterization of DNA immobilized on gold. *Journal of the American Chemical Society* 2003; **125**(17): 5219-26.
105. Kosaka PM, González S, Domínguez CM, et al. Atomic force microscopy reveals two phases in single stranded DNA self-assembled monolayers. *Nanoscale* 2013; **5**(16): 7425-32.
106. Schreiner SM, Shudy DF, Hatch AL, Opdahl A, Whitman LJ, Petrovykh DY. Controlled and efficient hybridization achieved with DNA probes immobilized solely through preferential DNA-substrate interactions. *Analytical chemistry* 2010; **82**(7): 2803-10.
107. Herdt AR, Drawz SM, Kang Y, Taton TA. DNA dissociation and degradation at gold nanoparticle surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2006; **51**(2): 130-9.
108. Bhatt N, Huang P-JJ, Dave N, Liu J. Dissociation and degradation of thiol-modified DNA on gold nanoparticles in aqueous and organic solvents. *Langmuir* 2011; **27**(10): 6132-7.
109. Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for

- Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Infectious Diseases* 1990; **161**(5): 977-81.
110. Yuan M, Zhan S, Zhou X, et al. A method for removing self-assembled monolayers on gold. *Langmuir* 2008; **24**(16): 8707-10.
 111. Ansar SM, Ameer FS, Hu W, Zou S, Pittman Jr CU, Zhang D. Removal of molecular adsorbates on gold nanoparticles using sodium borohydride in water. *Nano letters* 2013; **13**(3): 1226-9.
 112. Arroyo-Hernández M, Tamayo J, Costa-Kramer J. Stress and DNA assembly differences on cantilevers gold coated by resistive and e-beam evaporation techniques. *Langmuir* 2009; **25**(18): 10633-8.
 113. Mertens J, Calleja M, Ramos D, Tarýn A, Tamayo J. Role of the gold film nanostructure on the nanomechanical response of microcantilever sensors. *Journal of applied physics* 2007; **101**(3): 034904.
 114. Tabard-Cossa V, Godin M, Burgess IJ, Monga T, Lennox RB, Grütter P. Microcantilever-based sensors: effect of morphology, adhesion, and cleanliness of the sensing surface on surface stress. *Analytical chemistry* 2007; **79**(21): 8136-43.
 115. Zhang L, Li Z, Zhou X, et al. Hybridization performance of DNA/mercaptohexanol mixed monolayers on electrodeposited nanoAu and rough Au surfaces. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2015; **757**: 203-9.
 116. Zhang N, Tan Z, Li J, Meng W, Xu L. Interactions of single-stranded DNA on microcantilevers. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 2011; **16**(6): 592-6.
 117. Wagman M, Medalion S, Rabin Y. Anomalous swelling of polymer monolayers by water vapor. *Macromolecules* 2012; **45**(23): 9517-21.
 118. Petrovykh DY, Kimura-Suda H, Tarlov MJ, Whitman LJ. Quantitative characterization of DNA films by X-ray photoelectron spectroscopy. *Langmuir* 2004; **20**(2): 429-40.

119. Petrovykh DY, Perez-Dieste V, Opdahl A, et al. Nucleobase orientation and ordering in films of single-stranded DNA on gold. *Journal of the American Chemical Society* 2006; **128**(1): 2-3.
120. Bosco A, Bano F, Parisse P, Casalis L, DeSimone A, Micheletti C. Hybridization in nanostructured DNA monolayers probed by AFM: theory versus experiment. *Nanoscale* 2012; **4**(5): 1734-41.
121. Mirmontaz E, Castronovo M, Grunwald C, et al. Quantitative study of the effect of coverage on the hybridization efficiency of surface-bound DNA nanostructures. *Nano letters* 2008; **8**(12): 4134-9.
122. Cao HH, Nakatsuka N, Serino AC, et al. Controlled DNA Patterning by Chemical Lift-Off Lithography: Matrix Matters. *ACS nano* 2015; **9**(11): 11439-54.
123. Arya SK, Solanki PR, Datta M, Malhotra BD. Recent advances in self-assembled monolayers based biomolecular electronic devices. *Biosensors and Bioelectronics* 2009; **24**(9): 2810-7.
124. Schoenfish MH, Pemberton JE. Air stability of alkanethiol self-assembled monolayers on silver and gold surfaces. *Journal of the American Chemical Society* 1998; **120**(18): 4502-13.
125. Willey TM, Vance AL, Van Buuren T, Bostedt C, Terminello L, Fadley C. Rapid degradation of alkanethiol-based self-assembled monolayers on gold in ambient laboratory conditions. *Surface Science* 2005; **576**(1): 188-96.
126. Flynn NT, Tran TNT, Cima MJ, Langer R. Long-term stability of self-assembled monolayers in biological media. *Langmuir* 2003; **19**(26): 10909-15.
127. Haile J. Molecular dynamics simulation: Wiley, New York; 1992.
128. Case D, JTB R, Betz D, Cerutti III T, Cheatham III T, Darden R. Duke, TJ Giese, H. Gohlke, AW Goetz, N Homeyer, S Izadi, P Janowski, J Kaus, A Kovalenko, TS Lee, S LeGrand, P Li, T Luchko, R Luo, B Madej, KM Merz, G Monard, P Needham, H Nguyen, HT Nguyen, I Omelyan, A Onufriev, DR Roe, A Roitberg, R Salomon-Ferrer, CL Simmerling, W

Smith, J Swails, RC Walker, J Wang, RM Wolf, X Wu, DM York, PA Kollman In *AMBER* 2015.

129. Saenger W, Hunter WN, Kennard O. DNA conformation is determined by economics in the hydration of phosphate groups. 1986.
130. Berman HM. Hydration of DNA. *Current Opinion in Structural Biology* 1991; **1**(3): 423-7.
131. Hansma HG, Revenko I, Kim K, Laney DE. Atomic force microscopy of long and short double-stranded, single-stranded and triple-stranded nucleic acids. *Nucleic acids research* 1996; **24**(4): 713-20.
132. Tinland B, Pluen A, Sturm J, Weill G. Persistence length of single-stranded DNA. *Macromolecules* 1997; **30**(19): 5763-5.
133. del Rey M, da Silva RA, Meneses D, et al. Monitoring swelling and deswelling of thin polymer films by microcantilever sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2014; **204**: 602-10.
134. Brokate M, MacCarthy S, Pimenov A, Pokrovskii A, Rachinskii D. Modelling energy dissipation due to soil-moisture hysteresis. *Environmental Modeling & Assessment* 2011; **16**(4): 313-33.
135. Dobrynin AV, Rubinstein M. Theory of polyelectrolytes in solutions and at surfaces. *Progress in Polymer Science* 2005; **30**(11): 1049-118.
136. Domínguez CM, Ramos D, Mendieta-Moreno JI, Fierro JLG, Mendieta J, Tamayo J, Calleja M. Effect of water-DNA interactions on elastic properties on DNA self-assembled monolayers. Submitted to *Scientific Reports*.
137. Schwartz DK. Mechanisms and kinetics of self-assembled monolayer formation. *Annual Review of Physical Chemistry* 2001; **52**(1): 107-37.
138. Tanchak OM, Barrett CJ. Swelling dynamics of multilayer films of weak polyelectrolytes. *Chemistry of materials* 2004; **16**(14): 2734-9.
139. Bloomfield V, Crothers DM. Nucleic acids: structures, properties and functions; 2000.

140. Ouldridge TE, Šulc P, Romano F, Doye JP, Louis AA. DNA hybridization kinetics: zippering, internal displacement and sequence dependence. *Nucleic acids research* 2013; **41**(19): 8886-95.
141. Hoefert MJ, Sambriski EJ, de Pablo JJ. Molecular pathways in DNA-DNA hybridization of surface-bound oligonucleotides. *Soft Matter* 2011; **7**(2): 560-6.
142. Schmitt TJ, Knotts IV TA. Thermodynamics of DNA hybridization on surfaces. *The Journal of chemical physics* 2011; **134**(20): 205105.
143. Hooyberghs J, Baiesi M, Ferrantini A, Carlon E. Breakdown of thermodynamic equilibrium for DNA hybridization in microarrays. *Physical Review E* 2010; **81**(1): 012901.
144. Medalion S, Wagman M, Grosberg A, Rabin Y. Network formation by cross-hybridization of complementary strands to grafted ssDNA. *ACS Macro Letters* 2014; **3**(2): 191-3.
145. Sekar MM, Bloch W, St John PM. Comparative study of sequence-dependent hybridization kinetics in solution and on microspheres. *Nucleic acids research* 2005; **33**(1): 366-75.
146. Halperin A, Buhot A, Zhulina E. Brush effects on DNA chips: thermodynamics, kinetics, and design guidelines. *Biophysical journal* 2005; **89**(2): 796-811.
147. Baumann CG, Smith SB, Bloomfield VA, Bustamante C. Ionic effects on the elasticity of single DNA molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1997; **94**(12): 6185-90.
148. Smith SB, Cui Y, Bustamante C. Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules. *Science* 1996; **271**(5250): 795.
149. Riccelli P, Merante F, Leung K, et al. Hybridization of single-stranded DNA targets to immobilized complementary DNA probes: comparison of hairpin versus linear capture probes. *Nucleic acids research* 2001; **29**(4): 996-1004.

150. Bishop J, Wilson C, Chagovetz A, Blair S. Competitive displacement of DNA during surface hybridization. *Biophysical journal* 2007; **92**(1): L10-L2.
151. Stillman BA, Tonkinson JL. Expression microarray hybridization kinetics depend on length of the immobilized DNA but are independent of immobilization substrate. *Analytical biochemistry* 2001; **295**(2): 149-57.
152. Toren P, Ozgur E, Bayindir M. Real-Time and Selective Detection of Single Nucleotide DNA Mutations Using Surface Engineered Microtoroids. *Analytical chemistry* 2015; **87**(21): 10920-6.
153. Irving D, Gong P, Levicky R. DNA surface hybridization: comparison of theory and experiment. *The Journal of Physical Chemistry B* 2010; **114**(22): 7631-40.
154. Peterson AW, Heaton RJ, Georgiadis RM. The effect of surface probe density on DNA hybridization. *Nucleic acids research* 2001; **29**(24): 5163-8.
155. Takashima A, Oishi M. Kinetic study of DNA hybridization on DNA-modified gold nanoparticles with engineered nano-interfaces. *RSC Advances* 2015; **5**(93): 76014-8.
156. Erickson D, Li D, Krull UJ. Modeling of DNA hybridization kinetics for spatially resolved biochips. *Analytical biochemistry* 2003; **317**(2): 186-200.
157. Tan Z, Zhang N, Meng W, Tang H. Mechanism for invalid detection of microcantilever-DNA biosensors due to environmental changes. *Journal of Physics D: Applied Physics* 2016; **49**(22): 225402.
158. Zhang N-H, Shan J-Y. An energy model for nanomechanical deflection of cantilever-DNA chip. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids* 2008; **56**(6): 2328-37.
159. Zhao Y, Ganapathysubramanian B, Shrotriya P. Cantilever deflection associated with hybridization of monomolecular DNA film. *Journal of Applied Physics* 2012; **111**(7): 074310.

160. Zhang N-H, Meng W-L, Tan Z-Q. A multi-scale model for the analysis of the inhomogeneity of elastic properties of DNA biofilm on microcantilevers. *Biomaterials* 2013; **34**(7): 1833-42.
161. Calleja M, Carrascosa LG, Tarin A, Tamayo J. Study of the adsorption of sulfur-derivatized single stranded DNA on gold by atomic force microscopy and the cantilever bending technique. *Sensor Letters* 2006; **4**(3): 275-80.
162. Shi L, Reid LH, Jones WD, et al. The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter-and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nature biotechnology* 2006; **24**(9): 1151-61.
163. Binder H, Preibisch S. Specific and nonspecific hybridization of oligonucleotide probes on microarrays. *Biophysical journal* 2005; **89**(1): 337-52.
164. Organization WH. Global tuberculosis report 2015. 2015.
165. Gandhi NR, Nunn P, Dheda K, et al. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *The Lancet* 2010; **375**(9728): 1830-43.
166. Borgdorff M, Soolingen Dv. The re-emergence of tuberculosis: what have we learnt from molecular epidemiology? *Clinical Microbiology and Infection* 2013; **19**(10): 889-901.
167. Helb D, Jones M, Story E, et al. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. *Journal of clinical microbiology* 2010; **48**(1): 229-37.
168. Wang S, Inci F, De Libero G, Singhal A, Demirci U. Point-of-care assays for tuberculosis: role of nanotechnology/microfluidics. *Biotechnology advances* 2013; **31**(4): 438-49.
169. Srivastava SK, van Rijn CJ, Jongsma MA. Biosensor-based detection of tuberculosis. *RSC Advances* 2016; **6**(22): 17759-71.
170. Siddiqi S, Ahmed A, Asif S, et al. Direct drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis for rapid detection of multidrug resistance

- using the Bactec MGIT 960 system: a multicenter study. *Journal of clinical microbiology* 2012; **50**(2): 435-40.
171. Wang S, Lifson MA, Inci F, Liang L-G, Sheng Y-F, Demirci U. Advances in addressing technical challenges of point-of-care diagnostics in resource-limited settings. *Expert review of molecular diagnostics* 2016; **16**(4): 449-59.
172. Lee W, Kwon D, Chung B, et al. Ultrarapid detection of pathogenic bacteria using a 3D immunomagnetic flow assay. *Analytical chemistry* 2014; **86**(13): 6683-8.
173. Costa P, Amaro A, Botelho A, Inácio J, Baptista PV. Gold nanoprobe assay for the identification of mycobacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Clinical Microbiology and Infection* 2010; **16**(9): 1464-9.
174. Veigas B, Jacob JM, Costa MN, et al. Gold on paper—paper platform for Au-nanoprobe TB detection. *Lab on a Chip* 2012; **12**(22): 4802-8.
175. Thiruppathiraja C, Kamatchiammal S, Adaikkappan P, Santhosh DJ, Alagar M. Specific detection of *Mycobacterium* sp. genomic DNA using dual labeled gold nanoparticle based electrochemical biosensor. *Analytical biochemistry* 2011; **417**(1): 73-9.
176. Prabhakar N, Arora K, Arya SK, et al. Nucleic acid sensor for *M. tuberculosis* detection based on surface plasmon resonance. *Analyst* 2008; **133**(11): 1587-92.
177. Ren J, He F, Yi S, Cui X. A new MSPQC for rapid growth and detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biosensors and Bioelectronics* 2008; **24**(3): 403-9.
178. He F, Zhang L. Rapid diagnosis of *M. tuberculosis* using a piezoelectric immunosensor. *Analytical sciences* 2002; **18**(4): 397-401.
179. Lee H, Sun E, Ham D, Weissleder R. Chip–NMR biosensor for detection and molecular analysis of cells. *Nature medicine* 2008; **14**(8): 869-74.
180. Mahillon J, Chandler M. Insertion sequences. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1998; **62**(3): 725-74.

181. Van Embden J, Cave MD, Crawford JT, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *Journal of clinical microbiology* 1993; **31**(2): 406-9.
182. Kalokhe AS, Shafiq M, Lee JC, et al. Multidrug-resistant tuberculosis drug susceptibility and molecular diagnostic testing: a review of the literature. *The American journal of the medical sciences* 2013; **345**(2): 143.
183. Donolato M, Antunes P, de la Torre TZG, et al. Quantification of rolling circle amplified DNA using magnetic nanobeads and a Blu-ray optical pick-up unit. *Biosensors and Bioelectronics* 2015; **67**: 649-55.
184. Lang HP, Loizeau F, Hiou-Feige A, et al. Piezoresistive Membrane Surface Stress Sensors for Characterization of Breath Samples of Head and Neck Cancer Patients. *Sensors* 2016; **16**(7): 1149.
185. Lai LM, Goon IY, Chuah K, et al. The biochemiresistor: An ultrasensitive biosensor for small organic molecules. *Angewandte Chemie International Edition* 2012; **51**(26): 6456-9.
186. Huang H, Bai W, Dong C, Guo R, Liu Z. An ultrasensitive electrochemical DNA biosensor based on graphene/Au nanorod/polythionine for human papillomavirus DNA detection. *Biosensors and Bioelectronics* 2015; **68**: 442-6.
187. Woodside MT, Anthony PC, Behnke-Parks WM, Larizadeh K, Herschlag D, Block SM. Direct measurement of the full, sequence-dependent folding landscape of a nucleic acid. *Science* 2006; **314**(5801): 1001-4.
188. Wang MD, Yin H, Landick R, Gelles J, Block SM. Stretching DNA with optical tweezers. *Biophysical journal* 1997; **72**(3): 1335.
189. Oliver PM, Park JS, Vezenov D. Quantitative high-resolution sensing of DNA hybridization using magnetic tweezers with evanescent illumination. *Nanoscale* 2011; **3**(2): 581-91.

190. Vander Wal M, Kamper S, Headley J, Sinniah K. Effects of contact force and salt concentration on the unbinding of a DNA duplex by force spectroscopy. *Langmuir* 2006; **22**(3): 882-6.
191. Sattin BD, Pelling AE, Goh MC. DNA base pair resolution by single molecule force spectroscopy. *Nucleic acids research* 2004; **32**(16): 4876-83.
192. Wang J, Wolf RM, Caldwell JW, Kollman PA, Case DA. Development and testing of a general amber force field. *Journal of computational chemistry* 2004; **25**(9): 1157-74.
193. Hornak V, Abel R, Okur A, Strockbine B, Roitberg A, Simmerling C. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 2006; **65**(3): 712-25.
194. Leckband D, Israelachvili J. Intermolecular forces in biology. *Quarterly reviews of biophysics* 2001; **34**(02): 105-267.
195. Bustamante C, Bryant Z, Smith SB. Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics. *Nature* 2003; **421**(6921): 423-7.
196. Watts JF, Wolstenholme J. An introduction to surface analysis by XPS and AES. *An Introduction to Surface Analysis by XPS and AES, by John F Watts, John Wolstenholme, pp 224 ISBN 0-470-84713-1 Wiley-VCH, May 2003* 2003: 224.
197. Koo KM, Sina AA, Carrascosa LG, Shiddiky MJ, Trau M. DNA–bare gold affinity interactions: mechanism and applications in biosensing. *Analytical Methods* 2015; **7**(17): 7042-54.
198. Bain CD, Troughton EB, Tao YT, Evall J, Whitesides GM, Nuzzo RG. Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. *Journal of the American Chemical Society* 1989; **111**(1): 321-35.
199. Tamayo J, Ramos D, Mertens J, Calleja M. Effect of the adsorbate stiffness on the resonance response of microcantilever sensors. *Applied physics letters* 2006; **89**(22): 224104.

200. Ruz J, Tamayo J, Pini V, Kosaka PM, Calleja M. Physics of nanomechanical spectrometry of viruses. *Scientific reports* 2014; **4**.
201. Falk M, Hartman KA, Lord R. Hydration of deoxyribonucleic acid. I. A gravimetric study. *Journal of the American Chemical Society* 1962; **84**(20): 3843-6.
202. Cagliani A, Kosaka P, Tamayo J, Davis ZJ. Monitoring the hydration of DNA self-assembled monolayers using an extensional nanomechanical resonator. *Lab on a Chip* 2012; **12**(11): 2069-73.
203. Chen X, Goodnight D, Gao Z, et al. Scaling up nanoscale water-driven energy conversion into evaporation-driven engines and generators. *Nature communications* 2015; **6**.
204. Reineke TM. Stimuli-Responsive Polymers for Biological Detection and Delivery. *ACS Macro Letters* 2015; **5**(1): 14-8.
205. Oliveira MB, Mano JF. Natural-Based and Stimuli-Responsive Polymers for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Polymers in Regenerative Medicine: Biomedical Applications from Nano-to Macro-Structures* 2015: 49-90.
206. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Principles and practice of infectious diseases: Elsevier Health Sciences; 2014.
207. Hawkey P. The growing burden of antimicrobial resistance. *Journal of antimicrobial chemotherapy* 2008; **62**(suppl 1): i1-i9.
208. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *The Lancet infectious diseases* 2008; **8**(3): 159-66.
209. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends in molecular medicine* 2012; **18**(5): 263-72.
210. Pitout JD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2015; **59**(10): 5873-84.

211. Grundmann H, Livermore D, Giske C, et al. Carbapenem-non-susceptible Enterobacteriaceae in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Eurosurveillance* 2010.
212. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases* 2011; **17**(10): 1791-8.
213. Matsumura Y, Pitout JD. Recent advances in the laboratory detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Expert review of molecular diagnostics* 2016: 1-12.
214. Doi Y, Paterson DL. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Seminars in respiratory and critical care medicine*; 2015: Thieme Medical Publishers; 2015. p. 074-84.
215. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *Twenty-fifth informational supplement CLSI document M100-S25* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2015.
216. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Journal of clinical microbiology* 2012; **50**(2): 477-9.
217. Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, et al. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clinical microbiology and infection* 2010; **16**(2): 112-22.
218. van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, Schouls LM. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PloS one* 2015; **10**(3): e0123690.
219. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 2012; **18**(9): 1503-7.
220. Tijet N, Boyd D, Patel SN, Mulvey MR, Melano RG. Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing

- Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2013; **57**(9): 4578-80.
221. Nordmann P, Poirel L, Carrër A, Toleman MA, Walsh TR. How to detect NDM-1 producers. *Journal of clinical microbiology* 2011; **49**(2): 718-21.
 222. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2011; **70**(1): 119-23.
 223. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors—occurrence, properties and removal. *Journal of applied microbiology* 2012; **113**(5): 1014-26.
 224. Hedman J, Rådström P. Overcoming inhibition in real-time diagnostic PCR. *PCR detection of microbial pathogens* 2013: 17-48.
 225. Yang S, Rothman RE. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *The Lancet infectious diseases* 2004; **4**(6): 337-48.
 226. Findlay J, Hopkins KL, Meunier D, Woodford N. Evaluation of three commercial assays for rapid detection of genes encoding clinically relevant carbapenemases in cultured bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2015; **70**(5): 1338-42.
 227. Lawlor MS, O'Connor C, Miller VL. Yersiniabactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infection. *Infection and immunity* 2007; **75**(3): 1463-72.
 228. Burckhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *Journal of clinical microbiology* 2011; **49**(9): 3321-4.
 229. Hrabák J, Chudáčková E, Papagiannitsis C. Detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clinical Microbiology and Infection* 2014; **20**(9): 839-53.

230. Bogaerts P, Yunus S, Massart M, Huang T-D, Glupczynski Y. Evaluation of the BYG Carba test, a new electrochemical assay for rapid laboratory detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of clinical microbiology* 2016; **54**(2): 349-58.
231. Notake S, Matsuda M, Tamai K, Yanagisawa H, Hiramatsu K, Kikuchi K. Detection of IMP metallo- β -lactamase in carbapenem-nonsusceptible Enterobacteriaceae and non-glucose-fermenting Gram-negative rods by immunochromatography assay. *Journal of clinical microbiology* 2013; **51**(6): 1762-8.
232. Van Eysden CA, Sader JE. Frequency response of cantilever beams immersed in viscous fluids with applications to the atomic force microscope: Arbitrary mode order. *Journal of applied physics* 2007; **101**(4): 044908.

Lista de publicaciones

La presente tesis doctoral se basa en las siguientes publicaciones:

1. Kosaka PM, González S, **Domínguez CM**, Cebollada A, San Paulo A, Calleja M, Tamayo J. Atomic force microscopy reveals two phases in single stranded DNA self-assembled monolayers. *Nanoscale* 5, 7425-7432 (2013).
2. **Dominguez CM**, Kosaka PM, Mokry G, Pini V, Malvar O, del Rey M, Ramos D, San Paulo A, Tamayo J, Calleja M. Hydration induced stress on DNA monolayers grafted on microcantilevers. *Langmuir* 30, 10962-10969 (2014).
3. **Domínguez CM**, Kosaka PM, Sotillo A, Mingorance J, Tamayo J, Calleja M. Label-free DNA-based detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampicin resistance through hydration induced stress in microcantilevers. *Analytical chemistry* 87, 1494-1498 (2015).
4. **Domínguez CM**, Ramos D, Mendieta-Moreno JI, Fierro JLG, Mendieta J, Tamayo J, Calleja M. Effect of water-DNA interactions on elastic properties of DNA self-assembled monolayers. Aceptado para revisión en *Scientific Reports*.

5. **Domínguez CM**, Ramos D, Mingorance J, Tamayo J, Calleja M. Direct detection of OXA-48 carbapenemase gene in lysate samples harnessing hydration-induced mechanical properties alteration of DNA layers upon hybridization. En preparación.